



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

THEORY AND PRACTICE OF MEAT PROCESSING

ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА ПЕРЕРАБОТКИ МЯСА

Vol. 2 (4), 2017

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 20.12.17.

Тираж 1000 экз. Заказ № 625.

Типография ФНЦПС.

© ФНЦПС, 2017

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 ФГБОУ ВПО «Российский
государственный аграрный университет имени
К.А. Тимирязева», Москва, Россия

Жайлаубаев Жанибек Далелович, доктор технических наук,
член корреспондент АСХН РК, директор СФ ТОО «Казахский
научно-исследовательский институт перерабатывающей
и пищевой промышленности»,
г. Семей, Республика Казахстан

Замарацкая Гая, 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

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

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

Римарева Любовь Вячеславовна, доктор технических
наук, профессор, чл.-корр. 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 20.12.17.

Circulation — 1000 copies. Order № 625.

Printing house — FNCFC.

© FNCFC, 2017

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,
corresponding member 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,
Director of FGBNU «The All-Russian Research Institute of Beef
Cattle», Orenburg, Russia

Liubov V. Rimareva, doctor of technical sciences, professor,
corresponding member 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, Sagami-hara, 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

Чернуха И.М., Никонов И.Н., Машенцева Н.Г., Клабукова Д.Л., Афанасьев Д.А., Ковалев Л.И., Ильина Л.А. ВЛИЯНИЕ СПОНТАННОЙ МИКРОФЛОРЫ ФЕРМЕНТИРОВАННЫХ МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ ИЗ КОНИНЫ НА ОБРАЗОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ.....	4
--	---

Настасиевич И., Лакичевич Б., Петрович З. УПРАВЛЕНИЕ ХОЛОДИЛЬНОЙ ЦЕПЬЮ ПРИ ПОСТАВКАХ МЯСА: «СТАРЫЕ» И НОВЫЕ СТРАТЕГИИ	20
---	----

Саката Р., Такеда С., Вага М. ИССЛЕДОВАНИЕ ПО СНИЖЕНИЮ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НИТРИТА И НИТРАТА В МЯСНЫХ ПРОДУКТАХ ПРИ ДОБАВЛЕНИИ НАТУРАЛЬНОЙ СОЛИ И МОНООКСИДА УГЛЕРОДА.....	35
---	----

Чичерин И.Ю., Погорельский И.П., Лундовских И.А., Дармов И.В., Шабалина М.Р. ДИСБИОЗ КИШЕЧНИКА, ЗДОРОВЬЕ ЧЕЛОВЕКА И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ПИТАНИЕ.....	44
---	----

Баженова Б.А., Данилов А.М. ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТНОГО РАСТВОРА ИЗ ГОВЯЖЬЕГО ЦЕЛЬНОГО СЫЧУГА ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ СВОЙСТВ КОЛЛАГЕНСОДЕРЖАЩЕГО РУБЦА.....	62
--	----

Батаева Д.С., Минаев М.Ю., Юшина Ю.К., Соколова О.В., Зайко Е.В. КОНЦЕПТУАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К ЭКСПРЕСС-ВЫЯВЛЕНИЮ САМПУЛОБАКТЕР SPP. В МЯСЕ УБОЙНЫХ ЖИВОТНЫХ.....	76
---	----

Вострикова Н.Л., Кузнецова О.А., Куликовский А.В., Минаев М.Ю. ФОРМИРОВАНИЕ НАУЧНОГО БАЗИСА МЕТА-ДАННЫХ, СВЯЗАННЫХ С ОЦЕНКАМИ «ОНКО-» РИСКОВ, АССОЦИИРОВАННЫМИ С МЯСНОЙ ПРОДУКЦИЕЙ	96
---	----

Махонина В.Н., Агафонов В.П. НАУЧНЫЙ ПОДХОД К ОПРЕДЕЛЕНИЮ СОРТА МЯСА ПТИЦЫ И ПТИЦЕПРОДУКТОВ	114
--	-----

CONTENTS

Irina M. Chernukha, Il'ya N. Nikonov, Natal'ya G. Mashentseva, Daria L. Klabukova, Dmitrii A. Afanasev, Leonid I. Kovalyov, Larisa A. Ilna AN INFLUENCE OF SPONTANEOUS MICROFLORA OF FERMENTED HORSEMEAT PRODUCTS ON THE FORMATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDES	5
--	---

Ivan Nastasijevic, Brankica Lakicevic and Zoran Petrovic COLD CHAIN MANAGEMENT IN MEAT SUPPLY: «OLD» AND NOVEL STRATEGIES	20
---	----

Sakata R., Takeda S., Waga M. STUDY ON DECREASE OF NITRITE AND NITRATE USAGE IN PROCESSED MEAT WITH ADDITION OF NATURAL SALT AND CARBON MONOXIDE.....	35
--	----

IgorYu. Chicherin, Ivan P. Pogorelsky, Irina A. Lundovskikh, IlyaV. Darmov, Marina R. Shabalina INTESTINAL DYSBIOSIS, HUMAN HEALTH AND FUNCTIONAL NUTRITION	44
---	----

Bayana A. Bazhenova, Andrey M. Danilov PREPARATION OF THE ENZYME SOLUTION FROM THE WHOLE BOVINE ABOMASUM FOR MODIFICATION OF PROPERTIES OF THE COLLAGEN CONTAINING RUMEN	62
--	----

Dagmara S. Bataeva, Mihail Yu. Minaev, Yuliya K. Yushina, Olga V. Sokolova, Elena V. Zajko CONCEPTUAL APPROACHES TO THE RAPID DETECTION OF CAMPYLOBACTER SPP. IN MEAT OF SLAUGHTER ANIMALS	76
---	----

Natal'ya L. Vostrikova, Oksana A. Kuznetsova, Andrey V. Kulikovskii, Mikhail Yu. Minaev FORMATION OF THE SCIENTIFIC BASIS OF META-DATA ASSOCIATED WITH ESTIMATES OF «ONCO-» RISKS LINKED TO MEAT PRODUCTS	96
--	----

Valentina N. Makhonina, Valerij P. Agafonychev THE SCIENTIFIC APPROACH OF DETERMINATION POULTRY GRADE AND POULTRY PRODUCTS	114
---	-----

ВЛИЯНИЕ СПОНТАННОЙ МИКРОФЛОРЫ ФЕРМЕНТИРОВАННЫХ МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ ИЗ КОНИНЫ НА ОБРАЗОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ

Чернуха И.М.¹, Никонов И.Н.², Машенцева Н.Г.³,

Клабукова Д.Л.⁴,* Афанасьев Д.А.³, Ковалев Л.И.⁵, Ильина Л.А.²

¹ Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Москва, Россия

² ООО «БИОТРОФ», Санкт-Петербург, Россия

³ Московский государственный университет пищевых производств, Москва, Россия

⁴ Институт прикладной биохимии и машиностроения «Биохиммаш», Москва, Россия

⁵ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук, Москва, Россия

Ключевые слова: пептиды, *Lactobacillus*, T-RFLP, одномерный электрофорез, двумерный электрофорез, протеомика, конина, мясные продукты

Аннотация

В настоящее время для накопления в мясном сырье функциональных пептидов используют различные методы, в том числе включающие использование спонтанной микрофлоры в ходе автолиза, использование ферментов микробного происхождения (применение стартовых культур) и использование ферментов немикробного происхождения (ферменты животного и растительного происхождения). Каждый из методов имеет свои специфические особенности воздействия на сырье, что требует их детального изучения. В данной статье рассматривается влияние спонтанной микрофлоры ферментированных мясных продуктов из конины на образование биологически активных пептидов. С использованием T-RFLP-анализа установлено, что в составе микрофлоры сыровяленной и сырокопченой колбас, произведенных с использованием мышечной ткани конины в виде мясного сырья, значительная часть микрофлоры представлена молочнокислыми микроорганизмами. Так, наибольшее содержание молочнокислой микрофлоры наблюдается в образце № 1 (52,45 %), а наименьшее — в образце № 3 (29,62 %). В образце № 2 наблюдается среднее процентное содержание микрофлоры по сравнению с образцами № 1 и № 3 — 38,82 %. Следует также отметить, что приблизительно 25 % микрофлоры относится к некультивируемой, т.е. имеющей метаболические процессы, но не дающей роста на питательных средах. В образцах обнаружены представители актиномицетов и псевдомонад. Патогенной и условно-патогенной микрофлоры не обнаружено. Сравнительное протеомное исследование методом электрофореза трех видов колбас из конины, выработанных с использованием стартовых культур по различным технологиям, показало количественные и качественные различия по нескольким белковым фракциям. Наибольшее отличие в количестве белковых полос наблюдается между образцами № 1/№ 2 и № 3. Белковый профиль конины в образце № 3 имел значительное количественное отличие от белковых профилей образцов № 1 и № 2. Так, количественное содержание белковых полос в образце № 3 в диапазоне молекулярных масс 45–250 кДа всего 4, в то время как в образцах № 1 и № 2 их вдвое больше. В исследуемых образцах наблюдаются не только количественные, но и качественные изменения. Так, в образце № 1 и № 2 обнаружены фракции амило-1,6-глюкозидазы, миозин связывающего белка С быстрого типа, глюкозо-6-фосфат изомеразы, тропонина I быстрых скелетных мышц, фосфоглицераткиназы, пируваткиназы и скелетномышечного актина, отсутствующие или уменьшающиеся в образце № 3. Таким образом, в исследуемой продукции наблюдалась сохранность основного спектра мышечных белков, а идентифицированные фракции очевидно, могут быть источниками новых функциональных пептидов. По результатам тандемной масс-спектрометрии по полученным массам были идентифицированы природные короткие пептиды, которые присутствовали в анализируемых экстрактах. В основном все они относились к разным пептидам конского миоглобина. Также было идентифицировано несколько фрагментов, среди которых обнаруживались тропонин-Т скелетномышечный быстрого типа и мышечная креатинкиназа. Полученные материалы можно рассматривать как экспериментальную основу для направленного воздействия стартовых культур с возможностью прогнозирования белкового и пептидного состава готового продукта, в т.ч. с целью получения биологически активных пептидов в них.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Чернуха И.М., Никонов И.Н., Машенцева Н.Г., Клабукова Д.Л., Афанасьев Д.А., Ковалев Л.И., Ильина Л.А. Влияние спонтанной микрофлоры ферментированных мясных продуктов из конины на образование биологически активных пептидов. Теория и практика переработки мяса. 2017;2(4):4-18. DOI:10.21323/2414-438X-2017-2-4-4-19

FOR CITATION: Chernukha I.M., Nikonov I.N., Mashentseva N.G., Klabukova D.L., Afanasev D.A., Kovalyov L.I., Ilina L.A. An influence of spontaneous microflora of fermented horsemeat products on the formation of biologically active peptides. Theory and practice of meat processing. 2017;2(4):4-18. (In Russ.) DOI:10.21323/2414-438X-2017-2-4-4-19

AN INFLUENCE OF SPONTANEOUS MICROFLORA OF FERMENTED HORSEMEAT PRODUCTS ON THE FORMATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDES

Irina M. Chernukha¹, Il'ya N. Nikonov², Natal'ya G. Mashentseva³, Daria L. Klabukova^{4,*}

Dmitrii A. Afanasev³, Leonid I. Kovalyov⁵, Larisa A. Ilina²

¹ V.M. Gorbato Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² «BIOTROPH» Limited, St. Petersburg, Russia

³ Moscow state university of food production, Moscow, Russia

⁴ Institute of Applied Biochemistry and Mechanical Engineering «Biochimash», Moscow, Russia

⁵ Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Key words: peptides, *Lactobacillus*, T-RFLP, one-dimensional electrophoresis, two-dimensional electrophoresis, proteomics, horsemeat, meat products

Abstract

At present, different methods are used to accumulate functional peptides in meat raw materials, including the use of spontaneous microflora during autolysis, the use of the microbial enzymes (the application of starter cultures) and the use of the non-microbial enzymes (enzymes of animals and plant origin). Each method has its own specific characteristics of an impact on raw materials, which requires their detail study. This paper examines an effect of spontaneous microflora of fermented meat products from horsemeat on formation of biologically active peptides. Using the T-RFLP analysis, it was established that in air dried and uncooked smoked sausages produced with the use of the muscle tissue of horsemeat as a raw material, a significant proportion of microflora was presented by lactic acid microorganisms. The highest content of lactic acid microflora was observed in sample 1 (52.45 %), and the least in sample 3 (29.62 %). Sample 2 had the medium percent content of microflora compared to samples 1 and 3 — 38.82 %. It is necessary to note that about 25 % of microflora was unculturable; i.e., it had metabolic processes but did not grow on culture media. In the samples, the representatives of Actinobacteria and Pseudomonadales were found. Pathogenic and conditionally pathogenic microflora was not detected. Not only quantitative but also qualitative changes were observed in the studied samples. For example, in samples 1 and 2, the fractions of amilo-1,6-glucosidase, fast-type muscle myosin-binding-protein C; glucose-6-phosphate isomerase; fast skeletal muscle troponin I, phosphoglycerate kinase, pyruvate kinase and skeletal muscle actin were found, which were absent or reduced in sample 3. Therefore, in the studied product, good preservation of the main spectra of muscle proteins was observed, and the identified fractions, apparently, can be sources of new functional peptides. Not only quantitative but also qualitative changes were observed in the studied samples. For example, in samples 1 and 2, the C-terminal fragments of the myosin heavy chain were found, which were absent in sample 3. Also, the significant content of myoglobin was revealed in samples 2 and 3, and the myosin light chain was found in sample 1. Therefore, in the studied product, good preservation of muscle proteins myosin and myoglobin, which can be a source of new functional peptides, was observed. Based on the results of tandem mass-spectrometry, the proteins and natural short peptides present in the analyzed extracts were identified by the obtained masses. They belonged mainly to different peptides of equine myoglobin. Also, we identified several fragments, among which fast skeletal muscle troponin T and muscle creatine kinase were found. The obtained materials can be regarded as an experimental basis for the directed impact of starter cultures with a possibility to predict the protein and peptide composition of a finished product including with the aim of obtaining biologically active peptides.

Введение

На сегодняшний день разработано множество стратегий по улучшению функциональной ценности мяса и мясных продуктов, которые могут быть реализованы путем добавления различных функциональных соединений, а также прижизненной модификацией животного сырья. В технологии мясных продуктов функционального и специализированного назначения успешно применяются модификацию состава (амино- и жирных кислот, контроля натрия хлорида), внесение функциональных элементов и специализированных модулей (растительных компонентов (масел, экстрактов, волокон), соевого белка, натуральных и синтетических антиоксидантов, молочнокислых бактерий, рыбьего жира, производных белков мяса — биологически активных пептидов).

Современная стратегия, направленная на увеличение продолжительности жизни за счет снижения риска хронических неинфекционных заболеваний, включает прогнозирование, превентивность или профилактику, персонализацию и партисипативность (принцип четырех «П») [1]. При этом научный прогноз об увеличении средней ожидаемой продолжительности жизни человека основан на многих направлениях, однако центральное место занимает создание средств эффективной и безопасной профилактики социально-значимых заболеваний. В России хронические неинфекционные заболевания являются причиной 75 % всех смертей. При этом на долю сердечно-сосудистых заболеваний приходится около 55 % [2].

В последние 10 лет во всем мире проводятся обширные исследования по изучению веществ белковой и пептидной природы, содержащихся в мясном сырье и готовых мясных продуктах [3,4]. Эти соединения образуются в процессе различной технологической обработки и обуславливают качественные и функциональные характеристики, а также безопасность готовых продуктов питания. Однако комплексное изучение механизмов их биосинтеза и деградации на молекулярном уровне практически не освещено. Стратегия изучения мясных белков как потенциальных источников биопептидов заключается в исследовании протеома на предмет наличия функциональных последовательностей и метаболитов, образованных в процессе автолиза, ферментации стартовыми культурами, а также гидролиза мясного сырья ферментами желудочно-кишечного тракта человека методами прикладной протеомики и биоинформатики [5,6].

Современные тенденции пищевой биотехнологии и биохимии мяса направлены на исследования по выявлению и идентификации белков и пептидов, характеризующих качественные характеристики во всех сырьевых источниках животного и растительного происхождения [7,8]. В настоящее время из мясного сырья, в особенности из мышечных белков говядины, курицы, свинины, выделено большое количество полипептидных веществ, содержащих примерно 2–30 аминокислот, нативно присутствующих в мясном сырье или образующихся в процессе технологической обработки. Выявлен ряд коротких пептидов, обладающих гипотензивным, опиоидным, антиоксидантным, антитромботическим и другими биологическими эффектами, которые оказывают влияние на ряд наиболее общих патогенетических механизмов, лежащих в основе развития патологических процессов [6,9,10]. Так в мясных белках содержатся аминокислотные последовательности, обладающие гипотензивными свойствами (куриный миозин, говяжий коллаген $\alpha 1$, свиной тропонин C), стимуляторы убиквитин-регулируемого протеолиза (куриный миозин, говяжий коллаген $\alpha 1$, свиной тропонин C), антиамнестической и антитромботической активностями (говяжий коллаген $\alpha 1$), антибактериальными (куриный миозин), иммуномодулирующими (говяжий коллаген $\alpha 1$) и опиоидными свойствами (говяжий коллаген $\alpha 1$, свиной тропонин C), ингибиторы дипептидилпептидазы IV (куриный миозин, говяжий коллаген $\alpha 1$, свиной тропонин C), а также регуляторы активности слизистой оболочки желудка (говяжий коллаген $\alpha 1$). Так, в легкой цепи миозина имеются наборы аминокислотных последовательностей с противомикробными свойствами: коннектин богат пептидами с антитромботической, антиамнестической, опиоидной, нейропротекторной, иммуномодуляторной, антиоксидантной и гипотензивной активностями, а также ингибиторами дипептидилпептидазы IV

и регуляторами активности слизистой оболочки желудка. Говяжий, куриный и свиной актин несут последовательности-ингибиторы дипептидилпептидазы IV. Коллаген и эластин наиболее богаты последовательностями, несущими определенные корректирующие свойства за счет высокого содержания глицина и пролина. Так, в данных белках идентифицировано уже более 220 функциональных пептидов. Предположительно, гипополипидемический эффект обусловлен влиянием на экспрессию генов, отвечающих за липидный обмен. Было показано, что гидролизат свиного эластина снижает концентрацию общего холестерина и атерогенных классов липопротеинов в сыворотке крови крыс с моделью гиперхолестеринемии. Указанный эффект присваивается пептидам с низким соотношением метионин/глицин и лизин/аргинин, а также образованию лизиновых мостиков (десмозин и изодесмозин). Также было показано, что гидролизат свиной печени снижает уровень подкожного жира за счет подавления активности печеночных ферментов — участников липогенеза. Гидролизат коллагена куриных ножек оказывает благоприятный эффект при остеопорозе в периоде женской менопаузы, гидролизаты куриного мяса и костей способствуют лучшей колонизации кишечника бифидобактериями и могут быть использованы в качестве пребиотиков, коллагеновые гидролизаты стимулируют пролиферацию фибробластов, нейтрофилов и моноцитов, что является частью иммунокорректирующего действия [11,12].

Для накопления в мясном сырье функциональных пептидов используют различные методы, в том числе включающие автолиз или прямой гидролиз, а также ферментацию (с использованием спонтанной микрофлоры, стартовых культур или ферментов).

Некоторые исследования показали возможность производства различных биоактивных пептидов, включая антимикробные, иммуномодулирующие, антиокислительные и ингибирующие ангиотензин-превращающий фермент (АПФ) посредством микробного протеолиза [13,14]. Так, несколько молочнокислых бактерий (например, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus*) выделяют биоактивные пептиды в процессе ферментации. Эта система состоит из ряда различных внутриклеточных пептидаз, включая эндопептидазы, аминопептидазы, дипептидазы и трипептидазы [15, 16].

Отмечено, что геном лактобацилл кодирует большее количество протеаз, пептидаз, аминокислотных пермеаз и олигопептидных транспортных систем, чем лактококки [17]. Например, олигопептидная транспортная система *L. lactis* транспортирует пептиды до по меньшей мере 18 остатков [18].

Однако протеолитические ферменты, высвобождаемые молочнокислыми бактериями, оказались очень разными в разных их видах и штаммах, что привело к возникновению разных групп биоактивных пептидов [19,20].

Lactobacillus helveticus, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* и *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4 обладают способностью модулировать кровяное давление, производя ангиотензин 1-конвертирующий фермент, ингибирующий пептиды (ингибиторы АПФ) из молочных белков [21].

В большинстве исследований биоактивных веществ из источников мяса основное внимание уделялось именно ингибирующим АПФ и антиоксидантным пептидам. В ферментированных мясных продуктах особое внимание уделяется контролю биогенных аминов: тирамина, кадаверина, путресцина и гистамина. Некачественная обработка, благоприятствующая загрязнению, является основной причиной слишком высокого содержания биоамина в мясе, однако в литературе были описаны также стартовые штаммы, обладающие способностью синтезировать биогенные амины, такие как *Lactobacillus curvatus* [22]. Чтобы предотвратить такой риск, следует учитывать селекцию отдельных стартовых культур, обладающих активностью аминоксидазы или способностью к синтезу бактериоцинов, с целью нивелировать нежелательные последствия спонтанных ферментаций.

В данной статье рассматривается влияние спонтанной микрофлоры ферментированных мясных продуктов из конины на образование биологически активных пептидов.

Материалы и методы

На первом этапе методом T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism — полиморфизм длин терминальных рестрикционных фрагментов) был проведен анализ микрофлоры 3 мясных продуктов из конины естественной ферментации:

- национального ферментированного мясного продукта «Казы», произведенного в Пензенской области. В состав «Казы» входят конина и конский жир с добавлением соли, сахара и чеснока. Конина получена от животных, содержащихся на пастбищном выращивании, партия 1 и 2 (соответственно образцы № 1 и 2);
- сырокопченого мясного продукта «Балык» из конины, произведенного по ТУ 9213–028–54780900–2011 на предприятии Московской области. В состав балыка входят конина, нитритно-посолочная смесь, чеснок, пряности, сахар, аскорбат натрия (образец № 3).

Для анализа микрофлоры продукта через 5 дней с момента изготовления в стерильных условиях были взяты 3 навески из внутренней части колбасы в количестве 1 г, из которых была приготовлена средняя проба гомогенизацией проб в керамической ступке. ДНК из пробы выделяли экстракцией фенолом/хлороформом в соотношении 1:1 и очисткой раствором СТАВ.

Для выделения ДНК 0,5 г средней пробы помещали в эппендорф (1,5 мл) с завинчивающейся крышкой. К пробе добавляли 500 мкл буфера I (СТАВ 2 %;

Tris-HCl 0,1 М; ЭДТА- Na_2 20 мМ; NaCl 1,4 М; pH 8,5) и 0,5 г стеклянных шариков (Хеликон, Россия). Пробу прогревали в течение 15 мин при 65 °С и гомогенизировали в течение 15 мин на персональном вортексе V-1 plus (Biosan, Латвия) при 3000 оборотов, затем повторяли прогревание в течение 15 мин. Далее пробу экстрагировали в течение 10 мин при 14000 оборотов в центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия) 400 мкл смесью фенол/хлороформ (1:1), затем 400 мкл хлороформа, отбирая каждый раз супернатант в новый эппендорф объемом 1,5 мл. После этого в центрифуге при 14000 оборотов осаждали ДНК 400 мкл 96 % спирта в присутствии раствора натрия ацетата до конечной концентрации 0,3 М (Хеликон, Россия) и растворяли в 100 мкл буфера TE (Tris-HCl 10 мМ; ЭДТА- Na_2 1 мМ) (Хеликон, Россия).

ПЦР-амплификацию генов 16S рРНК бактерий проводили с использованием праймеров 63F (CAGGCCTAACACATGCAAGTC) с меткой на 5'-конце (флуорофор D4-WellRed) и 1492R (TACGGHTACCTTGTACGACTT). Смесь для ПЦР включала 10 пМ праймеров, 2,5 ед. Taq-полимеразы (Fermentas, США), X10 буфер для Taq-полимеразы (Fermentas, США), 2 мкл 25 мМ MgCl_2 (Fermentas, США); смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дТТФ — до конечной концентрации 150 мкМ), 1 мкл ДНК, деионизированной водой доводили пробу до объема 20 мкл. ПЦР проводили в амплификаторе МахуGene (Axygen, США) при условиях: 95 °С — 3 мин, 35 циклов (95 °С — 30 сек, 55 °С — 30 сек, 72 °С — 60 сек), 72 °С — 10 мин.

Амплифицированный фрагмент выделяли из агарозного геля с помощью 3М раствора гуанидина-тиоционата. Для этого из агарозного геля вырезали агарозный блок с амплифицированным фрагментом ДНК и помещали в эппендорф объемом 1,5 мл. К блоку добавляли 100 мкл раствора А (3 М гуанидин-изотиоцианат, 20 мМ EDTA- Na_2 , 10 мМ Tris-HCl (pH 6,8), 40 мг/мл TritonX-100) (Хеликон, Россия), нагревали до 65 °С до полного растворения блока агарозы. Далее пробу перемешивали, добавляли 20 мкл раствора В (1000 мкл раствора А, 40 мг/мл ДНК-сорбента Silica) (Хеликон, Россия) и инкубировали 10 мин при комнатной температуре, периодически перемешивая. Далее осаждали амплификат с сорбентом в центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия) при 4000 об/мин в течение 1 мин и полностью отбирали раствор. Аналогичным образом промывали осадок силики с ДНК со 100 мкл растворов А, С (25 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, 25 % изопропанол, 100 мМ NaCl, 10 мМ TRIS-HCl, pH 8,0) (Хеликон, Россия) и 70 % спиртом. После этого осадок высушивали и элюировали ДНК в 100 мкл раствора 10 мМ Tris-HCl (pH 8,0) (Хеликон, Россия) в течение 15 мин при комнатной температуре. Далее раствор центрифугировали 3 мин при 14000 об/мин и отбирали в новые пробирки очищенный препарат ДНК.

Рестриктию ампликонов проводили с помощью рестриктаз HaeIII, HhaI и MspI (Fermentas, США) в течение 2 ч при 37°C. Общий объем реакционной смеси составлял 15 мкл: 10 ед. рестриктазы, 1,5 мкл буфера для рестрикции и до 15 мкл деионизированной воды. После окончания рестрикции ДНК из реакционной смеси осаждали этанолом в количестве 38 мкл в присутствии 1,5 мкл 3М раствора ацетата натрия, далее растворяли в 10 мкл SLS (Beckman Coulter, США) с добавлением 0,2 мкл маркера молекулярного веса 600 п.н. (Beckman Coulter, США) и разделяли в условиях капиллярного электрофореза (программа Frag4) с флуоресцентной детекцией с использованием автоматического секвенатора CEQ8000 (Beckman Coulter, США).

Вычисление размеров пиков и их площади проводили с использованием программного блока FragmentAnalysis (BeckmanCoulter, США). Погрешность определения площади пиков при T-RFLP-анализе составляет не более 5%. Для идентификации пиков T-RFLP-граммы для трех эндонуклеаз (HaeIII, HhaI и MspI) обрабатывали с помощью программы FragmentSorter (<http://www.oardc.ohio-state.edu/trflpfragsort/index.php>).

Вторым этапом работы было проведение анализа фракционного состава белков исследуемых образцов методом одномерного электрофореза в 12,5% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в камере «VE-10» (Хеликон, Россия) при постоянном напряжении 60 В. По достижении фронта разделяющего геля увеличивали напряжение до 130 В и продолжали разделение в течение 2–2,5 ч [23]. Количество внесенного белка в гель составляло 20 мкг для всех образцов. Концентрацию белка в пробах определяли биуретовым методом на фотометре BioChem SA (HTI, США). В качестве стандарта для электрофореза использовали маркер фирмы «Thermo», США, представляющий собой смесь 11 рекомбинантных белков (250, 150, 100, 70, 50, 40, 30, 20, 15, 10 и 5 кДа). Окрашивание проводили с использованием красителя Кумасси G-250. Белковый состав анализировали с помощью базы данных UniProtProteinData-Base (<http://www.uniprot.org/>) [25].

Идентификацию белковых фракций на ДЭ осуществляли после трипсинолиза [26] методами MALDI-TOF MS и MS/MS масс-спектрометрии на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex (Bruker, Германия) с УФ-лазером (336 нм) в режиме положительных ионов в диапазоне масс 500–8000 Да с калибровкой их по известным пикам автолиза трипсина. Анализ полученных масс-спектров триптических пептидов выполняли с помощью программы Mascot, опция Peptide Fingerprint (Matrix Science, США), с точностью определения массы МН⁺, равной 0,01 %, осуществляя поиск по базам данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI).

Математическую и статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2010.

Результаты и обсуждение

При анализе образцов конской колбасы методом T-RFLP установлено следующее соотношение микрофлоры, что показано в Табл. 1.

Большая часть микрофлоры колбасы — 52,45 % у образца № 1, 38,82 % у образца № 2 и 29,62 % у образца № 3 — представлена молочнокислыми микроорганизмами. Высокое содержание лактобактерий в образцах 1 и 2, по-видимому, обусловлено спонтанным протеканием процесса ферментации и отсутствием таких консервирующих агентов как нитрит и аскорбат натрия.

На некультивируемые микроорганизмы приходится приблизительно одна четвертая часть микрофлоры — 24,1 % у образца № 1, 22,01 % у образца № 2 и 25,17 % у образца № 3. Некультивируемые формы бактерий имеют метаболическую активность, но не растут на питательных средах. Переход в некультивируемую форму происходит при воздействии неблагоприятных факторов, однако при попадании в организм человека они могут рекультивироваться — оживать, что объясняет наличие природно-очаговых заболеваний. Поэтому информация об их присутствии в составе мясных продуктов является важной для оценки безопасности и качества продукции.

Помимо этого обнаружены актиномицеты *Microbacterium*, псевдомонады, *Burkholderia* sp., в т.ч. *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas* spp. и *Flavobacterium* spp.

Патогенных микроорганизмов и бактерий группы кишечных палочек выявлено не было.

Результаты проведенных электрофоретических исследований показали отличия между исследуемыми образцами, электрофореграммы которых изображены на Рис. 1.

При анализе результатов фракционирования белков исследованных образцов выявлено, что образцы № 1 и № 2 схожи по белковому профилю и имеют лишь незначительные отличия (в сторону уменьшения у образца № 2) в количестве в зоне белков 38–42, 23 и 15 кДа при окрашивании CBV R-250, который дает большую линейность связывания с белком. Образец № 3 явно отличался от них, что объясняется различием их составов и технологий производства. В нем содержится меньше белковых фракций, а некоторые исчезали практически полностью. Окрашивание более чувствительным методом (азотнокислым серебром) подтвердило выявленные изменения и позволило детектировать ряд других меняющихся в количестве фракций, представленных в минорном количестве.

Таблица 1. Состав бактериального сообщества конской колбасы, %

Микроорганизм	Образец		
	№ 1	№ 2	№ 3
Бактероиды	0	5,31 <i>Bacteroidetes</i>	20,06 <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Prevotella</i> sp.
Лактобактерии	52,45 <i>Lactobacillus</i> sp.	38,82 <i>Lactobacillus</i> sp. <i>Lactobacillus manihotivorans</i>	29,62 <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Lactococcus garvieae</i>
Бациллы	13,47 <i>Bacillus</i> sp., <i>Alicyclobacillus</i> sp.	7,73 <i>Alicyclobacillus</i> sp.	3,08 <i>Brevibacillus levickii</i> , <i>Saccharococcus thermophilus</i> , <i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> , <i>Paenibacillus</i> sp.
Бифидобактерии	0	0	0,77 <i>Bifidobacterium</i> sp.
Пропионибактерии	0	0	0,82 <i>Propionibacterium</i> sp.
Псевдомонады	0	0,26 <i>Pseudomonas</i> sp.	4,69 <i>Pseudomonas</i> sp.
Буркхолдерии	0	0	3,12 <i>Burkholderia</i> sp.
Протеобактерии	2,41 <i>Lysobacter</i> sp., <i>Pseudoxanthomonas</i> sp.	13,83 <i>Sphingomonas</i> , <i>Lysobacter</i> sp., <i>Pseudoxanthomonas</i> sp.	0,67 <i>Lysobacter</i> sp., <i>Brenneria quercina</i> , <i>Alteromonadaceae</i>
Ацидобактерии	0	2,33 <i>Acidobacterium</i> sp.	0
Бутиривибрио	0	0,5 <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	0
Эубактерии	0	0,74 <i>Eubacterium</i> sp.	0
Клостридии	0	0	0,58 <i>Clostridium innocuum</i>
Термоанаэробактерии	0	2,07 <i>Thermoanaerobacter cellulolyticus</i> , <i>Caldicellulosiruptor kronotskiensis</i>	0
Сукциникластикум	0	0	0,65 <i>Succinoclasticum ruminis</i>
Аркобактер	0	0,33 <i>Arcobacter</i> sp.	0
Энтеробактерии	0	0	0,14 <i>Brenneria quercina</i>
Актиномицеты	6,02 <i>Streptomyces</i> sp., <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Microbacterium</i> sp.	6,07 <i>Micromonospora</i> sp., <i>Streptomyces</i> sp., <i>Kocuria</i> sp.	9,28 <i>Streptomyces</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Saccharomonosporaglauca</i> , <i>Micromonospora</i> sp., <i>Brevibacterium</i> sp., <i>Amycolatopsis</i> sp., <i>Catellatospora</i> sp., <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Corynebacterium bovis</i>
Пептококки	1,55 <i>Desulfotomaculum</i> sp.	0	1,35 <i>Desulfotomaculum</i> sp., <i>Desulfotomaculum kuznetsovii</i>
Некультивируемые бактерии	24,1	22,01	25,17

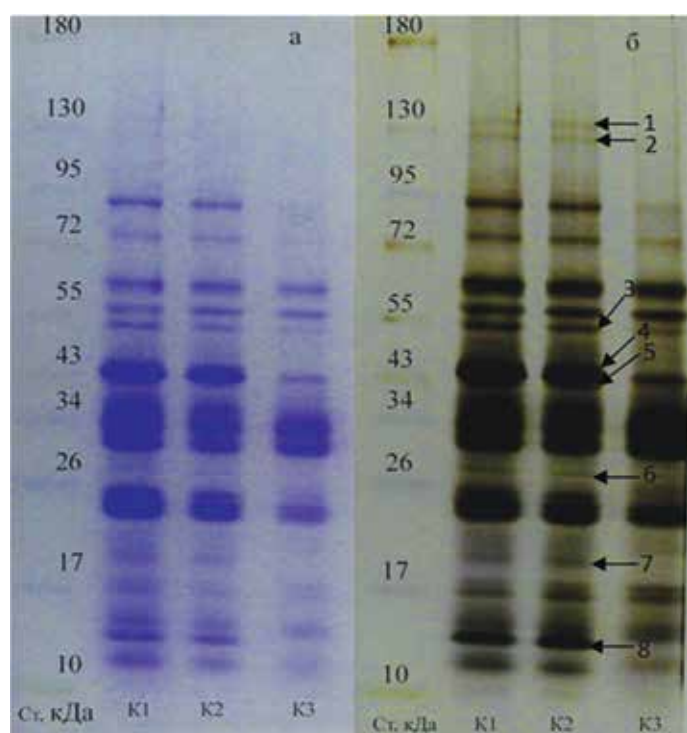


Рис. 1. Одномерный SDS электрофорез образцов мясных продуктов. Ст — смесь стандартных белков, K1 — образец № 1, K2 — образец № 2, K3 — образец № 3. Левая колонка (а) — окраска CBV R-250, правая (б) — азотнокислым серебром

К ним относились фракции с молекулярной массой 132, 128, 75, 90, 53, 45, 36, 28, 20 и 16 кДа. Белки этих фракций и являются основными компонентами, генерирующими короткие пептиды. Восемь из

них были идентифицированы времяпролетной масс-спектрометрией.

Так, в образцах № 1 и № 2 обнаружены фракции амило-1,6-глюкозидазы, миозин связывающего белка С быстрого типа, глюкозо-6-фосфат изомеразы, тропонина I быстрых скелетных мышц, фосфоглицераткиназы, пируваткиназы и скелетномышечного актина, отсутствующие или уменьшающиеся в образце № 3. Результаты идентификации представлены в Табл. 2.

С учетом результатов тандемной масс-спектрометрии по полученным массам были идентифицированы белки, природные короткие пептиды которых присутствовали в анализируемых экстрактах. В основном все они относились к разным пептидам конского миоглобина (Табл. 3).

Образцы № 1 и 2 сходны по спектрам, что объясняется сходством их состава и условий протекания процесса ферментации, в них присутствовали идентичные пики масс, а в образце № 3 имелись более выраженные различия. Набор одинаковых пептидов миоглобина первых двух образцов отсутствовал в образце № 3, но выявлялся свой пептид, при наличии во всех трех образцах пептида тропонина Т. Кроме этого, были определены протяженные последовательности трех неизвестных белков. При анализе в ручном режиме удалось выяснить, что пептид с m/z 2000.9168 является пептидом 14–28 аминокислотной последовательности М-креатинкиназы мышечного типа, данный пик есть во всех видах исследованных колбас.

Таблица 2. Результаты масс-спектрометрической идентификации (MALDI-TOFMS и MS / MS) белковых фракций, отличающихся по количеству в исследованных образцах

№	Наименование белка; некоторые синонимы, (символ гена)	Номера в Protein NCBI	S / M / C*	Мм, кДа (эксп.)**	Мм, кДа (расчет.)**
1	Фрагмент 43–1221 а.п. амило-1,6-глюкозидазы; glycogen debranching enzyme (AGL)	NP 001103778.1	163/22/18	132,0	174,6
2	Миозин связывающий белок С быстрого типа; myosin-binding protein C, fast-type (MYBPC2)***(1)	XP 005596801.1	117/9/15	128,0	115,1
3	Глюкозо-6-фосфат изомераза; glucose-6-phosphate isomerase (GPI)***(2) + Acetyl (Protein N-term)	XP 001490657.2	79/15/27	53,0	62,7
4	Гомолог фосфоглицераткиназы 1; phosphoglycerate kinase 1 [Equus przewalskii] (PGK1)***(1)	XP 008508104.1	75/25/61	43,1	45,0
5	Смесь изоформы M1 пируваткиназы; pyruvate kinase PKM isoform M1 (PKM) и гомолога скелетномышечного актина; actin, alpha skeletal muscle [Equus przewalskii] (ACTA1)	NP 00115316.1 XP 008531873.1	81/15/35 98/17/41	42,5	43,0 43,1
6	Смесь фрагмента 88–331 а.п. альдолазы А; fructose-bisphosphate aldolase A (ALDOA)***(1) и фрагмента 21–316 гомолога скелетномышечного актина; actin, alpha skeletal muscle [Equus przewalskii] (ACTA1)***(2)	XP 003362760 XP 008531873.1	107/7/29 42/29/61	28,0	39,4 43,1
7	Гомолог фрагмента 20–163 а.п. тропонина I быстрых скелетных мышц; tropinin I, fast skeletal muscle (TNNI2) [Equus asinus]***(2)	XP 014685731.1	244/20/59	19,0	21,4
8	Миоглобин; Myoglobin (MB)***(1)	NP 001157488.1	96/12/76	16,0	17,1

* S / M / C — традиционные показатели идентификации, принятые в англоязычной литературе: Score — показатель соответствия или «счет очков»; Match peptides — количество совпавших пептидов; Coverage — % покрытия полной аминокислотной последовательности белка выявленными пептидами.

** Мм (эксп.) — полученные оценки по результатам электрофоретической подвижности на ДЭ, а Мм (расчет.) — расчетные оценки, сделанные из данных об аминокислотной последовательности с учетом удаления сигнального пептида, но без учета других постсинтетических модификаций с помощью программы ExPASy Compute pI/Mw tool

***msms — указание на подтверждающую идентификацию с помощью тандемной масс-спектрометрии, в скобках указано количество секвенированных триптических пептидов.

Таблица 3. Результаты тандемной масс-спектрометрии коротких пептидов в экстрактах колбас

Название белка	m/z, аминокислотная последовательность пептида и номера позиций в белке		
	Образец № 1	Образец № 2	Образец № 3
Миоглобин	(1239.6175) SKHPGDFGADA (115–125)	–	–
Миоглобин	(1424.7059) SKHPGDFGADAQG (115–127)	–	–
Миоглобин	–	–	(2504.3236) KKKGNHEAELKP- LAQSHATENK (77–98)
Миоглобин	(2571.3249) GNHEAELKPLAQ- SHATENKIPIK (80–102)	+	–
Миоглобин	(2844.4926) GGILKKKGHNHEA- ELKPLAQSHATENK(73–98)	+	–
Миоглобин	(2955.5830) KKKGNHEAELKP- LAQSHATENKIPIK(77–102)	+	–
Неизвестный	(2000.9168) YKPREEYPDI/LSKHNN (14–28)	+	+
Неизвестный	(1711.8415) VWGKVEADI/ LAGHGQ	+	–
Неизвестный	–	–	(1858.9383) KI/LDESAKMEAETKI/LH
Тропонин Т, изоформа быстрого скелетно-мышечного типа (2–22)	+	+	(2637.9358) SDEEVENVEEYEEEEEAQEE (2–22)

Выводы

При анализе микрофлоры трех мясных продуктов из конины естественной ферментации — сыровяленной колбасы «Казы» и сырокопченой «Балык» — методом T-RFLP установлено, что во всех образцах молочнокислые микроорганизмы преобладали над прочими группами микроорганизмов. При этом некультивируемые микроорганизмы составляли одну четвертую часть всей микрофлоры продуктов. Были обнаружены также актиномицеты *Microbacterium*, псевдомонады, *Burkholderia* sp., относящиеся к условно-патогенным микроорганизмам, и бактерии *Pseudomonas* spp. и *Flavobacterium* spp., которые могут вызывать порчу мяса и мясных продуктов. Патогенных микроорганизмов в образцах выявлено не было.

Исследование данных продуктов методом одномерного электрофореза, показало различия в белковом профиле. В образце колбасы «Балык» содержалось меньше белковых фрагментов, чем в образцах «Казы».

Проведенное сравнительное протеомное исследование трех видов колбас показало количественные различия по нескольким фракциям. С учетом результатов тандемной масс-спектрометрии идентифицированы белки, природные короткие пептиды которых

присутствовали в анализируемых образцах. В основном они относились к разным пептидам конского миоглобина.

В целом в исследуемой продукции наблюдалась хорошая сохранность мышечных белков миозина и миоглобина, которые, очевидно, могут быть источниками функциональных пептидов. Различия в белковых профилях продуктов, по-видимому, обусловлены технологическими особенностями изготовления и спонтанным течением процесса ферментации.

Такими образом, спонтанная микрофлора ферментированных мясных продуктов, особенно при преобладании молочнокислых микроорганизмов, способна влиять на образование биологически активных пептидов мяса, что подтверждается исследованиями, результаты которых приведены в данной статье. Кроме того, предложенный подход и алгоритм поиска можно использовать для поиска и идентификации коротких природных пептидов в образцах колбас.

Выражение признательности (Acknowledgments)

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16–16–10073).

Introduction

At present, many strategies were developed to improve the functional value of meat and meat products, which can be realized by addition of different functional compounds and well as by ante mortem modification of animal raw materials. The technology of functional and specialized

products successfully uses the modification of the composition (amino- and fatty acids, control of sodium chloride), incorporation of functional elements and specialized modules (plant components (oils, extracts, fibers), soy protein, natural and synthetic antioxidants, lactic acid bacteria, fish oil and meat protein derivatives (biologically active peptides).

The modern strategy directed towards an increase in longevity due to a decrease in the risk of chronic noncommunicable diseases includes prediction, prevention, personalization and participativity (the principle of P4 medicine) [1]. With that, the scientific forecast about an increase in an average life expectancy of humans is based on many directions; however, the central place is occupied by the development of effective and safe prophylaxis of socially significant diseases. In Russia, chronic noncommunicable diseases are a cause of 75 % of all deaths. With that, the cardiovascular diseases account for about 55 % [2].

Over the last 10 years, extended studies on the substances of the protein and peptide nature in meat raw materials and finished meat products [3, 4] have been carried out. These compounds are formed in the process of different technological processing and stipulate quality and functional characteristics as well as safety of foods. However, the complex investigations on the mechanisms of their biosynthesis and degradation at the molecular level are practically not highlighted. The strategy for studying meat proteins as potential sources of biopeptides consists in investigation of proteome regarding the presence of functional sequences and metabolites formed during the autolysis process, fermentation by starter cultures as well as hydrolysis of meat raw materials with the human gastrointestinal enzymes using the methods of applied proteomics and bioinformatics [5,6].

The current trends in food biotechnology and meat biochemistry are directed towards investigations regarding detection and identification of proteins and peptides characterizing quality characteristics in all raw material sources of animal and plant origin [7,8]. At present, a great number of polypeptide substances containing about 2–30 amino acids, which exist initially in meat raw material or were formed during technological processing, have been extracted from meat raw materials, especially from beef, chicken and pork muscle proteins. A range of short peptides was revealed, which had hypotensive, opioid, antioxidant, antithrombotic and other biological effects that influenced a range of the most general pathogenetic mechanisms underlying the development of pathological processes [6,9,10]. For example, meat proteins contain amino acid sequences with the hypotensive activity (chicken myosin, beef collagen $\alpha 1$ and pork troponin C), stimulators of the ubiquitin-mediated proteolysis (chicken myosin, beef collagen $\alpha 1$ and pork troponin C), antiamnesic and antithrombotic activities (beef collagen $\alpha 1$), antibacterial (chicken myosin), immunomodulatory (beef collagen $\alpha 1$) and opioid properties (beef collagen $\alpha 1$, pork troponin C), inhibitors of dipeptidyl peptidase IV (chicken myosin, beef collagen $\alpha 1$, pork troponin C), as well as regulators of the activity of the gastric mucosa (beef collagen $\alpha 1$). For example, myosin light chain has the sets of the amino acid sequences with the antimicrobial properties: connectin is rich in the peptides with the antithrombotic, antiamnesic, opioid, neuroprotective, immunomodulatory, antioxidant and hypotensive activities, as well as inhibitors of dipeptidyl

peptidase IV and regulators of the activity of the gastric mucosa. Beef, chicken and pork actin carry the sequences — inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. Collagen and elastin are the richest in the sequences having specific corrective properties due to the high content of glycine and proline. More than 220 functional peptides have been already identified in the above mentioned proteins. Presumably, the hypolipidemic effect is conditioned by an influence on expression of the genes responsible for lipid metabolism. It was shown that the pork elastin hydrolysate reduces the concentration of total cholesterol and atherogenic lipoprotein classes in blood serum of the rats with a model of hypercholesterolemia. This effect is assigned to peptides with the low ratio of methionine/glycine and lysine/ arginine, as well as formation of lysine bridges (desmosin and isodesmosin). In addition, it was demonstrated that the pork liver hydrolysate reduced the subcutaneous fat level due to suppression of the activity of liver enzymes — participants of lipogenesis. The chicken leg collagen hydrolysate has a positive effect in osteoporosis during menopause, chicken meat and bone hydrolysates facilitate better gut colonization with bifidobacteria and can be used as prebiotics; collagen hydrolysates stimulate proliferation of fibroblasts, neutrophils and monocytes, which is a part of immunocorrective action [11,12].

A number of methods are used for accumulation of functional peptides in raw meat including autolysis or direct hydrolysis, as well as fermentation (using spontaneous microflora, starter cultures or enzymes).

Several studies showed a possibility to produce different bioactive peptides, including the antimicrobial, immunomodulatory, antioxidant and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory activities by microbial proteolysis [13,14]. For example, several lactic acid bacteria (such as, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus*) produce bioactive peptides during fermentation. This system consists in a range of different intracellular peptidases, including endo-peptidases, amino-peptidases, di-peptidases and tri-peptidases [15,16].

It is noted that genome of lactobacilli codes more proteases, peptidases, amino acid permeases and oligopeptide transport systems than lactococcus [17]. For example, the oligopeptide transport system of *L. lactis* transports peptides, at least, up to 18 residues [18].

However, proteolytic enzymes released by lactic acid bacteria were very different in different species and strains, which led to emergence of different groups of bioactive peptides [19,20].

Lactobacillus helveticus, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4 have an ability to produce angiotensin I-converting enzyme (ACE), which can modulate blood pressure [21].

In the majority of studies of bioactive substances from meat sources, the main attention was paid precisely to ACE inhibitory and antioxidant peptides. In fermented meat products a special attention is paid to the control

of biogenic amines: tyramine, cadaverine, putrescine and histamine. Improper processing that favors contamination is a main cause of too high content of bioamine in meat; however, the literature also describes starter cultures that have an ability to synthesize biogenic amines, such as *Lactobacillus curvatus* [22]. To prevent this risk, it is necessary to take into consideration selection of individual starter cultures having the aminooxidase activity and capable of bacteriocine synthesis with the aim of leveling undesirable effects of spontaneous fermentation.

This paper examines an effect of spontaneous microflora of the fermented meat products from horsemeat on the development of the biologically active peptides.

Materials and methods

At the first stage, an analysis of microflora by terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) was carried out in three naturally fermented meat products from horsemeat:

- the national fermented product «Kazi» produced in Penzenskaya oblast. The composition of the product includes horsemeat and horse fat with addition of salt, sugar and garlic. Horsemeat was obtained from animals raised on pastures (lots 1 and 2; samples 1 and 2, respectively);
- the uncooked smoked meat product «Balyk» from horsemeat produced by TS9213–028–54780900–2011 in an enterprise in the Moscow district. The composition of «Balyk» includes horsemeat, the nitrite-curing mixture, garlic, spices, sugar, sodium ascorbate (sample 3).

For analysis of the product microflora, 3 samples of 1 g were taken from the inner part of the sausage in the sterile conditions 5 days after preparation. From these specimens, an average specimen was prepared by homogenization in a ceramic mortar. The DNA was recovered from the specimen by extraction with phenol/chloroform in a ratio of 1:1 and purification with the CTAB solution.

For DNA recovery, 0.5 g of the average specimen was transferred into an Eppendorf 1.5 ml tube with a screw cap. 500 µl of buffer I (CTAB 2%; Tris-HCl 0.1M; EDTA-Na₂ 20 mM; NaCl 1.4 M; pH 8.5) and 0.5 g of glass beads (Helicon, Russia) were added to the specimen. The specimen was heated at 65 °C for 15 min. and homogenized on a personal Vortex V-1 plus (Biosan, Latvia) at 3000 rpm for 15 min.; then, the heating process was repeated during 15 min. After that, the specimen was extracted at 14000 rpm for 10 min. in the centrifuge Mini Spin (Eppendorf, Germany) with 400 µl of phenol/chloroform mixture (1:1), then 400 µl of chloroform, each time transferring the supernatant into new Eppendorf 1.5 ml tubes. After that, DNA was settled in a centrifuge at 14000 rpm with 400 µl of 96 % ethanol in the presence of the sodium acetate solution to the final concentration of 0.3 M (Helicon, Russia) and dissolved in 100 µl of TE buffer (Tris-HCl 10 mM; EDTA-Na₂ 1 mM) (Helicon, Russia).

PCR amplification of the 16S rRNA genes of bacteria was carried out using the primers 63F (CAGGCCTAA-

CACATGCAAGTC) with a tag at the 5'-end (fluorophore D4-WellRed) and 1492R (TACGGHTACCTTGT-TACGACTT). The mixture for PCR contained 10 pM of primers, 2.5 units of *Taq* polymerase (Fermentas, USA), X10 buffer for *Taq* polymerase (Fermentas, USA), 2 µl of 25 mM MgCl₂ (Fermentas, USA); a mixture of deoxynucleotide triphosphates (dATP, dGTP, dCTP, dTTP to the final concentration of 150 µM), 1 µl of DNA; a sample was brought to a volume of 20 µl with deionized water. PCR was performed in the amplifier MaxyGene (Axygen, USA) under the following conditions: 95 °C — 3 min, 35 cycles (95 °C — 30 s, 55 °C — 30 s, 72 °C — 60 s), 72 °C — 10 min.

The amplified fragment was isolated from the agarose gel using the 3M guanidine thiocyanate solution. To this end, an agarose block with the amplified DNA fragment was cut from the agarose gel and put into Eppendorf 1.5 ml tubes. 100 µl of solution A (3M guanidine isothiocyanate, 20 mM EDTA-Na₂, 10 mM Tris-HCl (pH 6.8), 40 mg/ml of TritonX-100) (Helicon, Russia) was added to the block and heated to 65 °C until full dissolution of the agarose block. Then, the sample was mixed, 20 µl of solution B (1000 µl of solution A, 40 mg/ml of DNA sorbent Silica) (Helicon, Russia) were added and incubated at the room temperature for 10 min. with intermittent mixing. After that, the amplicon was settled with a sorbent in the centrifuge Mini Spin (Eppendorf, Germany) at 4000 rpm for 1 min. and the solution was fully removed. Similarly, the sediment of silica with DNA was washed with 100 µl of solution A, C (25 % C₂H₅OH, 25 % isopropanol, 100 mM NaCl, 10 mM TRIS-HCl, pH 8.0) (Helicon, Russia) and 70 % ethanol. After that, the sediment was dried and the DNA was eluted in 100 µl of 10 mM Tris-HCl solution (pH 8.0) (Helicon, Russia) for 15 min at the room temperature. Then, the solution was centrifuged at 14000 rpm for 3 min. and the purified DNA preparation was transferred into new tubes.

Restriction of amplicons was carried out with restriction enzymes *Hae*III, *Hha*I and *Msp*I (Fermentas, USA) at 37 °C for 2 hours. The total volume of the reaction mixture was 15 µl: 10 units of the restriction enzyme, 1.5 µl of buffer for restriction and up to 15 µl of deionized water. On completing restriction, DNA in the reaction mixture was settled with ethanol in an amount of 38 µl in the presence of 1.5 µl of 3M sodium acetate solution, then dissolved in 10 µl of SLS (BeckmanCoulter, USA) with addition of 0.2 µl of marker with the molecular weight of 600 bp (Beckman-Coulter, USA) and separated in the conditions of capillary electrophoresis (Frag4 program) with fluorescence detection using the automated sequencer CEQ8000 (Beckman-Coulter, USA).

Calculation of peak sizes and their areas was carried out using the Fragment Analysis software (Beckman Coulter, USA). The error of detection of peak areas at T-RFLP analysis is not more than 5 %. For identification of peaks, the T-RFLP patterns for three endonucleases (*Hae*III, *Hha*I

and *MspI*) were processed using Fragment Sorter (<http://www.oardc.ohio-state.edu/trflpfragsort/index.php>).

The second stage of the work was analysis of the protein fractional composition in the studied samples by one-dimensional electrophoresis in 12.5 % polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS) in a chamber VE-10 (Helicon, Russia) at a constant voltage of 60V. Upon reaching the front of the separating gel, the voltage was increased up to 130V and separation was continued for 2–2.5 hours [23]. An amount of protein introduced into the gel was 20 µg for all samples. The protein concentration in the samples was detected by the biuret method using a spectrophotometer BioChem SA (HTI, USA). As a standard for electrophoresis, we used a marker from Thermo, USA, which is a mixture of 11 recombinant proteins (250, 150, 100, 70, 50, 40, 30, 20, 15, 10 and 5 kDa). Staining was performed using Coomassie G-250. The protein composition was analyzed using the UniProt Protein Database (<http://www.uniprot.org/>) [25].

Identification of protein fractions on two-dimensional electrophoregrams (2DE) was performed after tryptic proteolysis [26] by MALDI-TOF MS and MS/MS mass-spectrometry using a MALDI-TOF mass-spectrometer Ultraflex («Bruker», Germany) with an UV-laser (336 nm) in the positive ion mode and a mass range of 500–8000 Da with their calibration according to the known trypsin autolysis peaks.

The obtained mass-spectra of tryptic peptides were analyzed by the Mascot software, Peptide Fingerprint option (Matrix Science, USA) with accuracy of MH⁺ mass detection of 0.01 %, with the use of the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Mathematical and statistical processing of the results was carried out using Microsoft Excel 2010.

Results and discussion

When analyzing the samples of horsemeat sausage by T-RFLP, the following ratio of microflora was established (Table 1).

Large part of sausage microflora (52.45 % in sample 1, 38.82 % in sample 2 and 29.62 % in sample 3) was presented by lactic acid microorganisms. The high content of *Lactobacillales* in samples 1 and 2 was apparently conditioned by the spontaneous process of fermentation and an absence of preserving agents such as sodium nitrite and ascorbate.

The unculturable microorganisms accounted for about a quarter of microflora: 24.1 % in sample 1; 22.01 % in sample 2 and 25.17 % in sample 3.

The unculturable forms of bacteria have the metabolic activity but do not grow on culture media. The transition to the unculturable form occurs at an exposure to unfavorable factors; however, when entering the human body, they can be re-cultivated (revived), which explains a presence of natural focal diseases. Therefore, information about their

presence in meat products is important for assessment of product safety and quality.

In addition, several other microorganisms were detected such as *Microbacterium*, *Pseudomonas* sp., *Burkholderia* sp., including *Burkholderia cepacia*, and *Flavobacterium* spp.

Pathogenic microorganisms and coliforms were not revealed.

The results of the performed electrophoretic investigations showed the differences between the studied samples, which electrophoregrams are presented in Fig. 1.

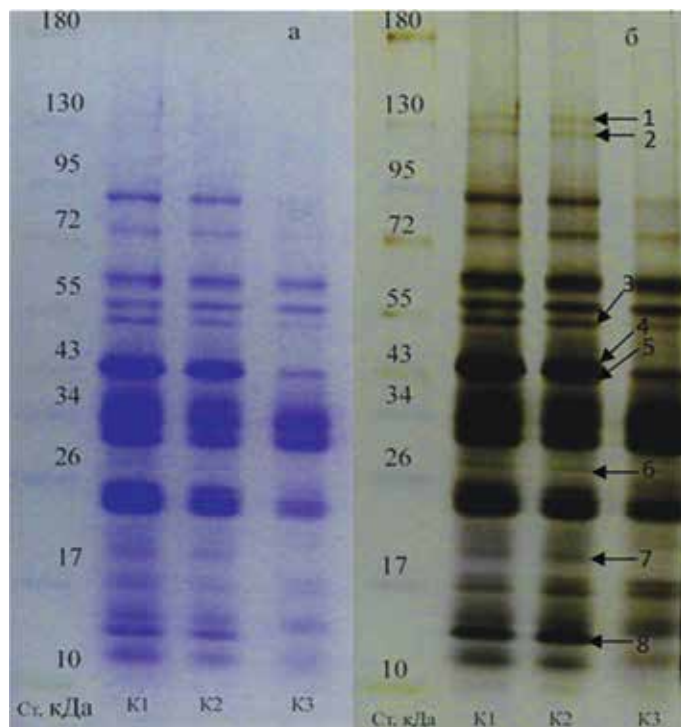


Fig. 1. One-dimensional SDS electrophoresis of meat product samples. Cr — mixture of standard proteins, K1 — sample 1, K2 — sample 2, K3 — sample 3. Left column (a) — staining with CBB G-250, Right column (b) — staining with silver nitrate.

When analyzing the results of protein fractionation in the studied samples, it was found that samples 1 and 2 were similar in the protein profile and had only insignificant differences (towards a decrease in sample 2) in the quantity of proteins in the zones 38–42, 23 and 15 kDa when staining CBB G-250, which gives high linearity of bonding with proteins. Sample 3 was clearly different from them, which can be explained by the differences in their compositions and production technology. It contained less protein fractions, and some of them disappeared practically completely. Staining by more sensitive method (with silver nitrate) confirmed the revealed changes and allowed detection of a range of other fractions that presented in the minor quantity and changed their quantity.

They included the fractions with the molecular weight of 132, 128, 75, 90, 53, 45, 36, 28, 20 and 16 kDa. The proteins of these fractions are the main components that generate short peptides. Eight of them were identified by time-of-flight mass-spectrometry.

Table 1. The composition of the bacterial community of horsemeat sausage, %

Microorganism	Sample		
	1	2	3
Bacteroidales	0	5.31 <i>Bacteroidetes</i>	20.06 <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Prevotella</i> sp.
Lactobacillales	52.45 <i>Lactobacillus</i> sp.	38.82 <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Lactobacillus manihotivorans</i>	29.62 <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Lactococcus garvieae</i>
Bacillales	13.47 <i>Bacillus</i> sp., <i>Alicyclobacillus</i> sp.	7.73 <i>Alicyclobacillus</i> sp.	3.08 <i>Brevibacillus levickii</i> , <i>Saccharococcus thermophilus</i> , <i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> , <i>Paenibacillus</i> sp.
Bifidobacteriales	0	0	0.77 <i>Bifidobacterium</i> sp.
Propionibacteriales	0	0	0.82 <i>Propionibacterium</i> sp.
Pseudomonadales	0	0.26 <i>Pseudomonas</i> sp.	4.69 <i>Pseudomonas</i> sp.
Burkholderiales	0	0	3.12 <i>Burkholderia</i> sp.
Proteobacteria	2.41 <i>Lysobacter</i> sp., <i>Pseudoxanthomonas</i> sp.	13.83 <i>Sphingomonas</i> , <i>Lysobacter</i> sp., <i>Pseudoxanthomonas</i> sp.	0.67 <i>Lysobacter</i> sp., <i>Brenneria quercina</i> , <i>Alteromonadaceae</i>
Acidobacteriales	0	2.33 <i>Acidobacterium</i> sp.	0
Clostridiales (<i>Butyrivibrio</i>)	0	0.5 <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	0
Clostridiales (<i>Eubacterium</i>)	0	0.74 <i>Eubacterium</i> sp.	0
Clostridiales (<i>Clostridium</i>)	0	0	0.58 <i>Clostridium innocuum</i>
Thermoanaerobacterales	0	2.07 <i>Thermoanaerobacter cellulolyticus</i> , <i>Caldicellulosiruptor kronotskiensis</i>	0
Clostridiales (<i>Succiniclasticum</i>)	0	0	0.65 <i>Succiniclasticum ruminis</i>
Campylobacterales	0	0.33 <i>Arcobacter</i> sp.	0
Enterobacteriales	0	0	0.14 <i>Brenneria quercina</i>
Actinobacteria	6.02 <i>Streptomyces</i> sp., <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Microbacterium</i> sp.	6.07 <i>Micromonospora</i> sp., <i>Streptomyces</i> sp., <i>Kocuria</i> sp.	9.28 <i>Streptomyces</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Saccharomonosporaglauca</i> , <i>Micromonospora</i> sp., <i>Brevibacterium</i> sp., <i>Amycolatopsis</i> sp., <i>Catellatospora</i> sp., <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Corynebacterium bovis</i>
Clostridiales (<i>Peptococcaceae</i>)	1.55 <i>Desulfotomaculum</i> sp.	0	1.35 <i>Desulfotomaculum</i> sp., <i>Desulfotomaculum kuznetsovii</i>
Unculturable microorganisms	24.1	22.01	25.17

Table 2. The results of the mass-spectrometric identification (MALDI-TOFMS and MS / MS) of the protein fractions differed in quantity in the studied samples

№	Protein, certain synonyms, (gene symbol)	Numbers in Protein NCBI	S / M/ C*	M _M , kDa (exper.)**	M _M , kDa (calc.)**
1	Fragment (43-1221 a.s.) of amilo-1,6-glucosidase; glycogendebranchingenzyme (AGL)	NP 001103778.1	163/22/18	132.0	174.6
2	myosin-bindingproteinC, fast-type (MYBPC2)***(1)	XP 005596801.1	117/9/15	128.0	115.1
3	glucose-6-phosphate isomerase (GPI)***(2)+ Acetyl (Protein N-term)	XP 001490657.2	79/15/27	53.0	62.7
4	phosphoglycerate kinase 1 homolog [Equusprzewalskii] (PGK1)***(1)	XP 008508104.1	75/25/61	43.1	45.0
5	MixtureofpyruvatekinasePKMisoformM1 (PKM) andskeletal muscle alpha-actinhomolog[Equusprzewalskii] (ACTA1)	NP 00115316.1 XP 008531873.1	81/15/35 98/17/41	42.5	43.0 43.1
6	MixtureofaldolaseAfragment (88–331 a.s.); fructose-bisphosphate aldolase A (ALDOA)***(1) andfragment (21-316) of skeletal muscle alpha-actin homolog[Equusprzewalskii] (ACTA1)***(2)	XP 003362760 XP 008531873.1	107/7/29 42/29/61	28.0	39.4 43.1
7	Homologoffragment (20–163 a.s.) oftroponinI, fastskeletal muscle (TNNI2) [Equusasinus]***(2)	XP 014685731.1	244/20/59	19.0	21.4
8	Myoglobin (MB)***(1)	NP 001157488.1	96/12/76	16.0	17.1

* S / M/ C — traditional indices for identification used in English literature;

Score — an indicator of matches or scoring;

Matchpeptides — the number of peptide matches;

Coverage — the percentage of the complete amino acid sequence of protein covered by revealed peptides.

** M_M (exper.) — assessments obtained by the results of the electrophoretic mobility on 2-DE, M_M (calc.) — calculated assessments made on the basis of the data on the amino acid sequence with consideration for removal of the signal peptide, but without consideration for other post-synthetic modifications using the program ExPASy Compute pI/Mw tool

*** msms — indication of the confirming identification using the tandem mass-spectrometry. The number of sequenced tryptic peptides are given in parentheses.

For example, in samples 1 and 2, the fractions of amilo-1,6-glucosidase, fast-type muscle myosin-binding-protein C; glucose-6-phosphate isomerase; fast skeletal muscle troponin I, phosphoglycerate kinase, pyruvate kinase and skeletal muscle actin were found, which were absent or reduced in sample 3. The results of identification are presented in Table 2.

Based on the results of the tandem mass-spectrometry, the proteins, which natural short peptides existed in the

analyzed extracts were identified by the obtained masses. Largely, they all belonged to different peptides of equine myoglobin (Table 3).

Samples 1 and 2 were similar in terms of spectra, which can be explained by the similarity of their composition and the conditions of the fermentation process; they had identical mass peaks, while sample 3 had more prominent differences.

A set of the same myoglobin peptides in the first two samples was absent in sample 3; however, its own peptide

Table 3. The results of the tandem mass-spectrometry of short peptides in sausage extracts

Protein	m/z, peptide amino acid sequence and position number in protein		
	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Myoglobin	(1239.6175) SKHPGDFGADA (115–125)	–	–
Myoglobin	(1424.7059) SKHPGDFGADAQG (115–127)	–	–
Myoglobin	–	–	(2504.3236) KKKGHHEAELKP-LAQSHATEHK (77–98)
Myoglobin	(2571.3249) GHHEAELKPLAQ- SHATEHKIPIK (80–102)	+	–
Myoglobin	(2844.4926) GGILKKKGHHEA-ELKPLAQSHATEHK (73–98)	+	–
Myoglobin	(2955.5830) KKKGHHEAELKP-LAQSHATEHKIPIK (77–102)	+	–
Unknown	(2000.9168) YKPEEEYPD/LSKHNN (14–28)	+	+
Unknown	(1711.8415) VWGKVEADI/LAGHGQ	+	–
Unknown	–	–	(1858.9383) KI/LDESAKMEAETKI/LH
troponin T, fast skeletal muscle isoform (2–22)	+	+	(2637.9358) SDEEVEHVEEEYEEEEAAQEE (2–22)

was revealed. The troponin T peptide was present in all three samples. Moreover, extended sequences of unknown proteins were detected. In analysis in manual mode, we were able to reveal that the peptide with m/z 2000.9168 is the peptide of 14–28 amino acid sequence of creatine kinase M of the muscle type; this peak is in all types of studied sausages.

Conclusions

In analysis of microflora in three naturally fermented meat products from horsemeat (air dried sausage «Kazi» and uncooked smoked sausages «Balyk» by T-RFLP, it was established that lactic acid microorganisms prevailed over other groups of microorganisms. With that, unculturable microorganisms accounted for about a quarter of microflora.

In addition, several other microorganisms were detected such as *Microbacterium*, *Pseudomonas* spp., *Burkholderia* sp., and *Flavobacterium* spp. Pathogenic microorganisms were not revealed in the samples.

The study of these products by one-dimensional electrophoresis showed the differences in the protein profile. The sausage sample «Balyk» contained less protein fragments than the «Kazi» samples.

The performed comparative proteomic study of three sausage types demonstrated quantitative differences by several fractions. Based on the results of the tandem mass spectrometry, the proteins and natural short peptides existed in the analyzed samples were identified. Largely, they all belonged to different peptides of equine myoglobin.

In general, good preservation of muscle proteins myosin and myoglobin, which can be a source of functional peptides, was observed. The differences in product protein profiles were, apparently, conditioned by the technological peculiarities of production and spontaneous course of the fermentation process.

Therefore, the spontaneous microflora of fermented meat products, especially upon prevalence of lactic acid microorganisms can affect the development of the biologically active peptides in meat, which is confirmed by the results of the study presented in this paper. Moreover, the applied approach and search algorithm can be used for search and identification of short natural peptides in sausage samples.

Acknowledgments

The study was financed by the grant of the Russian Scientific Foundation (Project No.16–16–10073).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Hood, L., Flores, M. (2012). A personal view on systems medicine and the emergence of proactive P4 medicine: predictive, preventive, personalized and participatory. *New Biotechnology*, 29 (6), 613–624.
- Тутельян, В.А., Самсонов, М.А., Каганов, Б.С., Батурин, А.К., Шарафетдинов, Х.Х., Плотникова, О.А., Павлючкова, М.С. (2008). Картотека блюд диетического (лечебного и профилактического) питания оптимизированного состава. Практическое руководство. М, Национальная ассоциация клинического питания.—448 с. ISBN978–5–85597–105–7
- Тутельян, В.А., Вялков, А.Н., Разумов, В.И., Москаленко, К.А., Одинец, А.Г., Сбежнева, В.Г., Сергеев, В.Н. (2010). Научные основы здорового питания. М, Панорама.—839 с. ISBN978–5–86472–224–4.
- Arihara, K. (2006). Strategies for designing novel functional meat products. *Meat Science*, 74, 219–229.
- Shishkin, S.S., Kovalev, L.I., Kovaleva, M.A., Ivanov, A.V., Eremina, L.S., Sadykhov, E.G. (2014). The application of proteomic technologies for the analysis of muscle proteins of farm animals used in the meat industry (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 50, 453–465.
- Olmedilla-Alonso, B., Jimenez-Colmenero, F., Sanchez-Muniz, F.J. (2013). Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods. *Meat Science*, 95, 919–930.
- Te Pas, M.F.W., Kruijt, L., Pierzchala, M., Crump, R.E., Boeren, S., Keuning, E., Hoving-Bolink, R., Hortos, M., Gispert, M., Arnau, J., Diestre, A., Mulder, H.A. (2013). Identification of proteomic biomarkers in *M. longissimusdorsi* as potential predictors of pork quality. *Meat Science*, 95, 679–687.
- Yu, T. — Y., Morton, J.D., Clerens, S., Dyer, J.M. (2015). Proteomic Investigation of Protein Profile Changes and Amino Acid Residue Level Modification in Cooked Lamb Meat: The Effect of Boiling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(41), 9112–9123.
- Chalamaiah, M., Jyothirmayi, T., Diwan, P.V., Dinesh Kumar, B. (2015). Antiproliferative, ACE-inhibitory and functional properties of protein hydrolysates from rohu (*Labeo rohita*) roe (egg) prepared by gastrointestinal proteases. *Journal of Food Science and Technology*, 52 (12), 8300–8307.
- Meinert, L., Broge, E.H.D.L., Bejerholm, C., Jensen, K. (2016). Application of hydrolyzed proteins of animal origin in processed meat. *Food Science and Nutrition*, 4(2), 290–297.
- Lafarga, T., Rai, D. K., O'Connor, P., Hayes, M. (2015). A bovine fibrinogen-enriched fraction as a source of peptides with *in vitro* renin and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 8676–8684.
- Minkiewicz, P., Dziuba, J., Michalska, J. (2011). Bovine meat proteins as potential precursors of biologically active peptides — a computational study based on the BIOPEP database. *Food Science and Technology International*, 17, 39–45.
- Gobbetti, M., Minervini, F., Rizzello, C.G. (2004). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 172–188.
- Korhonen, H., Pihlanto, A. (2003). Food-derived bioactive peptides — Opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1297–1308.
- Christensen, J.E., Dudley, E.G., Pederson, J.A., Steele, J.L. (1999). Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 76, 217–246.
- Doeven, M. K., Kok, J., Poolman, B. (2005). Specificity and selectivity determinants of peptide transport in *Lactococcus lactis* and other microorganisms. *Molecular Microbiology*, 57, 640–649.
- Klaenhammer, T. R., Barrangou, R., Buck, B.L., Azcarate-Peril, M. A., Altermann, E. (2005). Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 393–409.
- Savijoki K., Ingmer H., Varmanen P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 394–406.
- Hébert, E. M., Mamone, G., Picariello, G., Raya, R. R., Savoy, G., Ferranti, P., Addeo, F. (2008). Characterization of the pattern of α s1- and β -casein breakdown and release of a bioactive peptide by a cell envelope proteinase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (12), 3682–3689.
- Hébert, E. M., Raya, R. R., de Giori G. S. (1999). Characterisation of a cell-envelope proteinase from *Lactobacillus helveticus*. *Biotechnology Letters*, 21(9), 831–834.
- Hartmann, R., Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 163–169.
- Singh, V. P., Pathak, V., Verma, A. K. (2012). Fermented meat products: organoleptic qualities and biogenic amines—A review. *American Journal of Food Technology*, 7, 278–288.

23. Гааль, Э., Медбеши, Г., Верецкеи, Л. (1982). Электрофорез в разделении биологических макромолекул. (Перевод с английского канд. биол. наук Е. Б. Майзеля, канд. биол. наук М. С. Морозовой и канд. биол. наук С. Н. Хилько, под редакцией проф. В. И. Розенгарта). М, Мир. — 448 с.

24. Ковалев, Л.И., Шишкин, С.С., Ковалева, М.А., Иванов, В.В., Вострикова, Н.Л., Чернуха, И.М. (2013). Протеомное изучение белков в образцах свинины и выработанных из нее мясных продуктах. *Все о мясе*, 3, 32–34.

25. Kovalyov, L. I., Kovalyova, M. A., Kovalyov, P. L., Serebryakova, M. V., Moshkovskii, S. A., Shishkin, S.S. (2006). Polymorphism of $\Delta 3,5\text{-}\Delta 2,4$ -dienoyl-coenzyme a isomerase (the ECH1 gene product protein) in human striated muscle tissue. *Biochemistry (Moscow)*, 71(4), 448–453.

26. Zvereva, E.A., Kovalev, L.I., Ivanov, A.V., Kovaleva, M.A., Zherdev, A.V., Shishkin, S.S., Lisitsyn, A.B., Chernukha, I.M., Dzantiev, B.B. (2015). Enzyme immunoassay and proteomic characterization of troponin I as a marker of mammalian muscle compounds in raw meat and some meat products. *Meat Science*, 105(1), 46–52.

REFERENCES

1. Hood, L., Flores, M. (2012). A personal view on systems medicine and the emergence of proactive P4 medicine: predictive, preventive, personalized and participatory. *New Biotechnology*, 29 (6), 613–624.

2. Tutel'yan, V.A., Samsonov, M.A., Kaganov, B.S., Baturin, A.K., Sarafetdinov, H.H., Plotnikova, O.A., Pavluchkova, M.S. (2008). Card catalogue of dishes of dietary (curative and prophylactic) nutrition of the optimized composition. Practical guideline. M.: National association of clinical nutrition.— 448 p. ISBN 978–5–85597–105–7. (in Russian).

3. Tutel'yan V.A., Vyalkov A.I., Razumov A.N., Mikhailov V.I., Moskalenko K.A., Odinets A.G., Sbezheva V.G., Sergeev V.N. (2010). Scientific foundations of healthy nutrition. M, Panorama. — 839 p. ISBN 978–5–86472–224–4. (in Russian).

4. Arihara, K. (2006). Strategies for designing novel functional meat products. *Meat Science*, 74, 219–229.

5. Shishkin, S.S., Kovalev, L.I., Kovaleva, M.A., Ivanov, A.V., Ermina, L.S., Sadykhov, E.G. (2014). The application of proteomic technologies for the analysis of muscle proteins of farm animals used in the meat industry (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 50, 453–465.

6. Olmedilla-Alonso, B., Jimenez-Colmenero, F., Sanchez-Muniz, F.J. (2013). Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods. *Meat Science*, 95, 919–930.

7. Te Pas, M.F.W., Kruijt, L., Pierzchala, M., Crump, R.E., Boeren, S., Keuning, E., Hoving-Bolink, R., Hortos, M., Gispert, M., Arnau, J., Diestre, A., Mulder, H.A. (2013). Identification of proteomic biomarkers in *M. Longissimusdorsi* as potential predictors of pork quality. *Meat Science*, 95, 679–687.

8. Yu, T. — Y., Morton, J.D., Clerens, S., Dyer, J.M. (2015). Proteomic Investigation of Protein Profile Changes and Amino Acid Residue Level Modification in Cooked Lamb Meat: The Effect of Boiling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(41), 9112–9123.

9. Chalamaiiah, M., Jyothirmayi, T., Diwan, P.V., Dinesh Kumar, B. (2015). Antiproliferative, ACE-inhibitory and functional properties of protein hydrolysates from rohu (*Labeorohita*) roe (egg) prepared by gastrointestinal proteases. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 52 (12), 8300–8307.

10. Meinert, L., Broge, E.H.D.L., Bejerholm, C., Jensen, K. (2016). Application of hydrolyzed proteins of animal origin in processed meat. *Food Science and Nutrition*, 4(2), 290–297.

11. Lafarga, T., Rai, D. K., O'Connor, P., Hayes, M. (2015). A bovine fibrinogen-enriched fraction as a source of peptides with in vitro renin and angiotensin-i-converting enzyme inhibitory activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 8676–8684.

12. Minkiewicz, P., Dziuba, J., Michalska, J. (2011). Bovine meat proteins as potential precursors of biologically active peptides — a computational study based on the BIOPEP database. *Food Science and Technology International*, 17, 39–45.

13. Gobbetti, M., Minervini, F., Rizzello, C.G. (2004). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 172–188.

14. Korhonen, H., Pihlanto, A. (2003). Food-derived bioactive peptides — Opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1297–1308.

15. Christensen, J.E., Dudley, E.G., Pederson, J.A., Steele, J.L. (1999). Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, *International Journal of General and Molecular Microbiology*, 76, 217–246.

16. Doeven, M. K., Kok, J., Poolman, B. (2005). Specificity and selectivity determinants of peptide transport in *Lactococcus lactis* and other microorganisms. *Molecular Microbiology*, 57, 640–649.

17. Klaenhammer, T. R., Barrangou, R., Buck, B.L., Azcarate-Peril, M. A., Altermann, E. (2005). Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 393–409.

18. Savijoki K., Ingmer H., Varmanen P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 394–406.

19. Hébert, E. M., Mamone, G., Picariello, G., Raya, R. R., Savoy, G., Ferranti, P., Addeo, F. (2008). Characterization of the pattern of α s1- and β -casein breakdown and release of a bioactive peptide by a cell envelope proteinase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (12), 3682–3689.

20. Hébert, E. M., Raya, R. R., de Giori G. S. (1999). Characterisation of a cell-envelope proteinase from *Lactobacillus helveticus*. *Biotechnology Letters*, 21(9), 831–834.

21. Hartmann, R., Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 163–169.

22. Singh, V. P., Pathak, V., Verma, A. K. (2012). Fermented meat products: organoleptic qualities and biogenic amines—A review. *American Journal of Food Technology*, 7, 278–288.

23. Gaal, O., Medgyesi, G.A., Vereczkey, L. (1980). Electrophoresis in the Separation of Biological Macromolecules. Budapest, Akademiai Kiado.

24. Kovalyov, L.I., Shishkin, S.S., Kovalyova, M.A., Ivanov, A.V., Vostrikova, N.L., Chernukha, I.M. (2013). Proteomic research proteins in a sample of pork meat products. *Vsyo o myase*, 3, 32–34. (in Russian).

25. Kovalyov, L. I., Kovalyova, M. A., Kovalyov, P. L., Serebryakova, M. V., Moshkovskii, S. A., Shishkin, S.S. (2006). Polymorphism of $\Delta 3,5\text{-}\Delta 2,4$ -dienoyl-coenzyme a isomerase (the ECH1 gene product protein) in human striated muscle tissue. *Biochemistry (Moscow)*, 71(4), 448–453.

26. Zvereva, E.A., Kovalev, L.I., Ivanov, A.V., Kovaleva, M.A., Zherdev, A.V., Shishkin, S.S., Lisitsyn, A.B., Chernukha, I.M., Dzantiev, B.B. (2015). Enzyme immunoassay and proteomic characterization of troponin I as a marker of mammalian muscle compounds in raw meat and some meat products. *Meat Science*, 105 (1), 46–52.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Принадлежность к организации

Чернуха Ирина Михайловна — доктор технических наук, профессор, член-корреспондент РАН, Руководитель научного направления центра, Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН

109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26

Тел.: раб. +7-495-676-97-18

E-mail: imcher@inbox.ru

Никонов Илья Николаевич — заместитель директора по науке и развитию, ООО «БИОТРОФ»

196650, г. С.-Петербург, г. Колпино, Ижорский Завод, д. 45, литера ДВ

Тел.: +7-812-322-85-50

E-mail: nikonov@biotrof.ru

Машенцева Наталья Геннадьевна — доктор технических наук, профессор РАН, заведующий кафедрой «Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза», Московский государственный университет пищевой промышленности

125080 г. Москва, Волоколамское шоссе, 11

Тел.: +7-499-811-00-03, доб. 6883

E-mail: natali-mng@yandex.ru

Клабукова Дарья Леонидовна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела технологий и препаратов на основе культур клеток, Институт прикладной биохимии и машиностроения «Биохиммаш»

127299, Москва, ул. Клары Цеткин, д. 4

Тел.: +7-495-459-06-64

E-mail: daria.klabukova@yandex.ru

*автор для контактов

Афанасьев Дмитрий Александрович — студент, Институт инновационных технологий и биоиндустрии продуктов питания, Московский государственный университет пищевой промышленности

125080 г. Москва, Волоколамское шоссе, 11

Тел.: +7-985-456-77-82

E-mail: dmitr.afanasjew2010@yandex.ru

Ковалев Леонид Иванович — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биомедицинских исследований, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2

Телефон: раб. +7-495-952-58-86

E-mail: kovalyov@inbi.ras.ru

Ильина Лариса Александровна — кандидат биологических наук, начальник лаборатории ООО «БИОТРОФ»

196650, г. С.-Петербург, г. Колпино, Ижорский Завод, д. 45, литера ДВ

Тел.: +7-812-322-85-50

E-mail: ilina@biotrof.ru

Критерии авторства

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 27.09.2017

AUTHOR INFORMATION

Affiliation

Irina M. Chernukha — doctor of technical sciences, professor, corresponding members of RAS, Head of the scientific direction of the center, V.M. Gorbato Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences 109316, Moscow, Talalikhina str., 26

Tel.: +7-495-676-97-18

E-mail: imcher@inbox.ru

Ilya N. Nikonov — deputy director for research and development, «BIOTROPH» Limited

196650, St. Petersburg, Kolpino, Izhorsky factory, 45, lit. DV

Tel.: +7-812-322-85-50

E-mail: nikonov@biotrof.ru

Natalya G. Mashentseva — doctor of technical sciences, professor RAS, head of the Department of Biotechnology and Technology of Products of Bioorganic Synthesis, Moscow state university of food production

125080, Moscow, Volokolamskoe sh., 11

Tel.: +7-499-811-00-03, ext. 6883

E-mail: natali-mng@yandex.ru

Daria L. Klabukova — candidat of biological sciences, senior research scientist of Department of technologies and products based on cell cultures

OJSC Institute of Applied Biochemistry and Mechanical Engineering «Biochimash»

127299, Moscow, Clary Tcetkin str., 4

Tel.: +7-495-459-06-64

E-mail: daria.klabukova@yandex.ru

*corresponding author

Dmitrii A. Afanasev — student, Institute of Innovative Technologies and Bioindustry of Food Products, Moscow State University of Food Production

125080, Moscow, Volokolamskoe sh., 11

Tel.: +7-985-456-77-82

E-mail: dmitr.afanasjew2010@yandex.ru

Leonid I. Kovalyov — doctor of biological sciences, leading research scientist of the biomedical research laboratory, Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences, 119071, Moscow, Leninsky prospekt, 33 bldg. 2

Phone: +7-495-952-58-86

E-mail: kovalyov@inbi.ras.ru

Larisa A. Ilina — candidat of biological sciences, head of laboratory, «BIOTROPH» Limited

196650, St. Petersburg, Kolpino, Izhorsky factory, 45, lit. DV

Tel.: +7-812-322-85-50

E-mail: ilina@biotrof.ru

Contribution

The authors equally contributed to the writing of the manuscript and are equally responsible for plagiarism.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Received 27.09.2017

УПРАВЛЕНИЕ ХОЛОДИЛЬНОЙ ЦЕПЬЮ ПРИ ПОСТАВКАХ МЯСА: «СТАРЫЕ» И НОВЫЕ СТРАТЕГИИ

Настасиевич И.,*Лакичевич Б., Петрович З.

Институт гигиены мяса и технологии, Белград, Сербия

Ключевые слова: поставка мяса, порча, холодильная цепь, хранение, дистрибуция, розничная торговля

Аннотация

Мясо это скоропортящийся продукт с коротким сроком годности и, следовательно, с коротким сроком реализации. Поэтому, управление холодильной цепью при поставке имеет первостепенное значение для поддержания качества и безопасности мяса и мясных продуктов. Сырое мясо и мясные продукты могут поддерживать рост патогенных микроорганизмов или микроорганизмов, вызывающих порчу, и, таким образом, должны храниться при температурах, которые исключают возникновение риска здоровью. Холодильная цепь должна соблюдаться на всех этапах реализации. В связи со сложностью глобальной цепи поставок мяса и мясных продуктов, которая нередко бывает достаточно протяженной и связанной с транспортировкой продукта, как в внутри страны, так и при поставках из одной страны в другую, или с одного континента на другой, требуется необходимость соблюдать режимы охлаждения и замораживания, отслеживать время и температуру, чтобы потребитель был уверен в свежести данных продуктов и их безопасности. В настоящее время существует несколько доступных вариантов контроля и управления холодильной цепью, таких как комбинации хранения в охлажденном и замороженном виде, суперохлаждение, ионизирующее излучение, биоконсервация, высокое гидростатическое давление (ННП), активная упаковка, беспроводные датчики поддерживаемые компьютерной базой данных холодильной цепи (CCD).

Review paper

COLD CHAIN MANAGEMENT IN MEAT SUPPLY: «OLD» AND NOVEL STRATEGIES

Ivan Nastasijevic*, Brankica Lakicevic and Zoran Petrovic

Institute of Meat Hygiene and Technology, Belgrade, Serbia

Keywords: meat supply, spoilage, cold chain, storage, distribution, retail

Abstract

Meat is a perishable product with a short shelf life and therefore short selling times. Therefore, cold chain management in meat supply is of utmost importance for the maintenance of quality and safety of meat/meat products. Raw meat/meat products are likely to support the growth of pathogenic microorganisms and/or spoilage bacteria, and should be kept at temperatures that do not result in a risk to health. The cold chain should not be interrupted at all times along the meat distribution chain. The complexity of global meat supply chain, with frequently long distribution chains associated with transportation of the product within one country, from one to another country and from one to another continent, makes the solutions for the chilling and freezing regimes, as well as monitoring of time-temperature profiles, very important for the overall success in delivery of product which will be accepted by consumer for its freshness and safety levels. From recently, there are several available options for control and management of the cold chain, such as chilled and frozen storage combinations, superchilling, ionizing radiation, biopreservation, high hydrostatic pressure (HHP), active packaging, wireless sensors, supported with the software-based cold chain database (CCD).

1. Введение

Мясо это скоропортящийся продукт с коротким сроком годности и следовательно с коротким сроком реализации. В отличие от свежих фруктов и овощей, упакованное мясо должно иметь на этикетке обозначенный срок годности [1]. Поддержание холодильной цепи является одним из основных принципов и базовым требованием законодательства Европейского союза (EU) по пищевой гигиене. Сырье,

ингредиенты, полуфабрикаты и готовые продукты, которые могут поддерживать рост патогенных микроорганизмов или микроорганизмов, вызывающих порчу, должны храниться при температурах, которые исключают возникновение риска здоровью. Холодильная цепь должна соблюдаться на всех этапах реализации [3].

Общеизвестно, что срок годности охлажденного мяса может быть увеличен с помощью различных ре-

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Настасиевич И., Лакичевич Б., Петрович З. Управление холодильной цепью при поставках мяса: «старые» и новые стратегии. Теория и практика переработки мяса. 2017; 2(4):20-34. DOI:10.21323/2414-438X-2017-2-4-20-34

FOR CITATION: Nastasijevic I., Lakicevic B., Petrovic Z. Cold chain management in meat supply: «old» and novel strategies. Theory and practice of meat processing. 2017; 2(4):20-34. (In Russ.) DOI:10.21323/2414-438X-2017-2-4-20-34

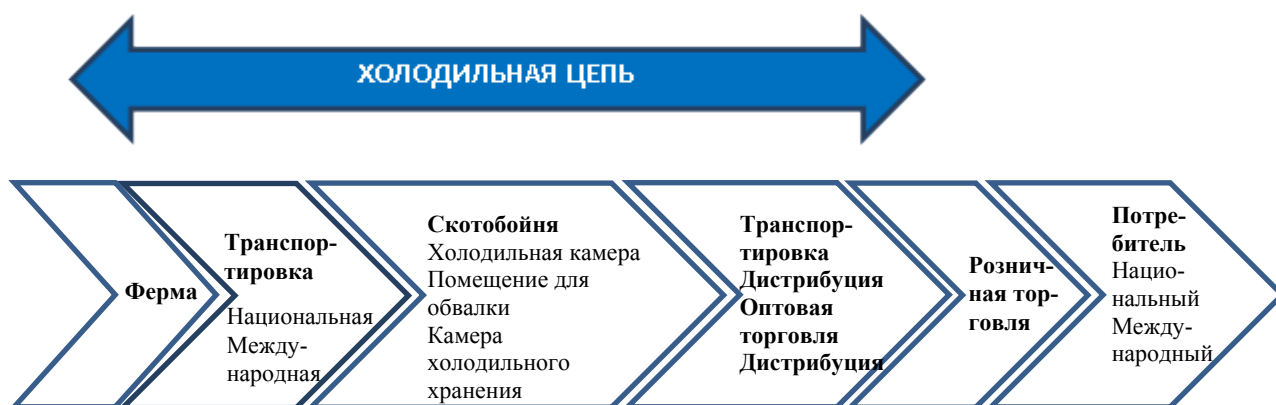


Рис. 1. Схема холодильной цепи при поставках мяса

шений в области упаковки, такими как вакуумная упаковка или упаковка с модифицированной атмосферой (МАР) [4, 5, 6]. Однако на сроки годности охлажденного мяса большое влияние оказывает температура. Неадекватная температура при хранении, транспортировании и в точках розничной торговли может привести к значительному сокращению срока годности и продолжительности хранения, и как следствие к порче мяса и мясных продуктов [6].

Здоровые животные, подвергнутые убою с соблюдением правил гигиены после надлежащего отдыха и голодной выдержки, дают практические асептическое мясо. Однако во время операций убоя, нутровки и разделки обычно происходит перекрестная контаминация микроорганизмами, особенно на поверхности мяса в результате контакта с оборудованием, инструментами, руками, одеждой, другими объектами и т. п. Мясо — это особенно благоприятная среда для роста микроорганизмов из-за его химического состава, например, большого количества белков, липидов и воды. Содержание липидов в мясе делает его очень чувствительным к окислению (реакции кислорода с жирными кислотами) и последующему производству пероксидов. Продукты распада пероксидов имеют характерный неприятный запах и вкус прогорклого мяса.

Существует несколько слабых точек в мясной холодильной цепи, как например, охлаждение продуктов во время хранения (перед отправкой), превышение температуры во время транспортировки и передаче продуктов от одного участника холодильной цепи другому, а также время ожидания во время комплектования и расформирования партий продукта в розничной торговле [7, 8, 9]. Нарушения температурных режимов приводит к изменениям качества продукции во время дистрибуции и в конце срока хранения, и может привести к порче до истечения срока годности, вызывая дополнительные затраты на ее утилизацию и, как следствие, к экономическим потерям.

На сегодняшний день были выявлены слабые места в холодильной цепи поставки, где распределение по цепи порой трудоемко и длительно (бойня-тран-

спортировка/поставка-розничная торговля-потребитель является постоянным потоком), например, для поставки мяса из одной страны в другую или с одного континента на другой (Рис. 1).

Поддержание безопасности и свежести охлажденного мяса до тех пор, пока оно не достигнет конечного потребителя является постоянной проблемой, поэтому первостепенное значение имеет управление холодильной цепью.

2. Порча мяса

Туши свиней, крупного рогатого скота (КРС), мелкого рогатого скота (МРС), а также тушки птицы сразу же охлаждаются по окончании послеубойной экспертизы на линии убоя и/или в холодильных камерах скотобойни. Процесс охлаждения — аэробный, так как туши обычно подвергаются воздействию циркулирующего воздуха. Наиболее часто, после 24–96 ч охлаждения, туши обычно перемещаются в помещение для обвалки/разделки, где они дополнительно разделяются на сортовые отруба. Сортовые отруба обычно хранят до 6 недель в вакуумных упаковках при анаэробных условиях [3]. Продукты из измельченного мяса могут быть приготовлены из тримминга от обвалки и/или тримминга от сортовых отрубов после 6 недель анаэробного хранения; они могут храниться аэробно или анаэробно (Рис. 2).

Известно, что охлаждение красного мяса и туш домашней птицы необходимо для задержки роста бактерий. Охлаждение также требуется для сохранения внешнего вида и потребительского качества мяса. Наиболее часто туши КРС, свиней и МРС охлаждают, используя принудительную конвекцию охлажденного воздуха [10], хотя также может использоваться охлаждение распылением (применение тонкого распыления), так как оно более быстрое по сравнению с воздушным охлаждением, и оно в основном используется для птицы, но также может применяться на предприятиях по переработке КРС, свиней и МРС.

В соответствии с Регламентом (ЕС) 853/2004/ЕС туши после убоя должны сразу же охлаждаться по

3. Управление холодильной цепью поставок мяса

Для успешной внутренней и международной торговли и при экспорте очень важно вакуумное хранение красного мяса и мяса птицы в виде герметично упакованного продукта в охлажденном или в замороженном состоянии при достаточно низких температурах [13]. Ранее были проведены полные исследования по влиянию длительного холодильного хранения и хранения при замораживании мяса и мясных продуктов для целей экспорта. [12, 14]. Было доказано, что при заморозке продолжительность хранения может быть увеличена на срок более одного года [15]. Несмотря на эти преимущества, улучшение в технологиях консервирования в современной экспортной холодильной цепи остается актуальным вопросом, особенно на промышленном уровне, включая потенциал развития суперохлаждения, ионизирующего излучения, био-консервирования и обработку высоким гидростатическим давлением или обработку высоким давлением (ННР) [16].

3.1. Холодильная цепь в скотобойне

В скотобойне холодильная цепь начинается с двух основных этапов:

- (а) первичное охлаждение (быстрое охлаждение туш после убоя), таким образом, чтобы в наиболее теплой точке туши (центр задней ноги) достигалась температура около 7°C и 3°C (для пищевых субпродуктов) и приблизительно 4°C для тушек птицы для предотвращения роста микроорганизмов и увеличения продолжительности хранения. При современных технологиях эти температуры можно получить спустя 16–24 часа в маленьких тушках (МРС), в течении 48 часов в больших тушах (говядья, свинья) и менее чем за 2 ч для тушек птицы (глубоко внутри грудок). Средние и поверхностные температуры намного ниже, достигая 0°C в течение 4 часов. Это очень важно для замедления пролиферации микроорганизмов;
- (б) вторичное охлаждение (поддержание температуры мяса ниже 7°C (красное мясо) и ниже 4°C (мясо птицы) в течение всего времени во время холодильного хранения, разделки, обвалки, измельчения перед транспортировкой).

Для охлаждения мяса перед транспортировкой наиболее распространены такие технологии, как: (i) воздушное охлаждение, (ii) иммерсионное охлаждение, (iii) охлаждение распылением, и (iv) вакуумное охлаждение [8].

3.1.1. Воздушное охлаждение. Эффективность применения воздушного охлаждения зависит от ряда факторов включая температуру воздуха, скорость воздушного потока, относительную влажность среды, массу туши, толщину шпика туш, а также загрузки хо-

лодильной камеры. Температура воздуха должна быть около 0°C, не снижаясь ниже минус 1°C, что может привести к замораживанию поверхности мяса и ухудшению его внешнего вида. Скорость воздуха может колебаться в диапазоне от 0, 25 до 3, 0 м/с. Однако по экономическим причинам, наиболее широко применяемые скорости находятся в диапазоне от 0, 75 до 1, 5 м/с. в пустой холодильной камере. Во время процедуры охлаждения должен поддерживаться высокий уровень влажности чтобы предотвратить чрезмерную потерю массы. Рекомендуемый уровень 90 % — 95 %, хотя это наиболее трудный для контроля параметр. Стоит отметить, что иногда быстрое охлаждение представляет собой проблемы из-за «холодового сокращения». Холодовое сокращение может часто наблюдаться в говядине и баранине, когда мясо, все еще в фазе посмертного окоченения, достигает температур 10°C и ниже. Эти условия вызывают необратимые сокращения мышечной ткани, что увеличивает жесткость мяса даже после продолжительного созревания. Быстрое первичное охлаждение приводит к увеличению стоимости продукции и более высоким эксплуатационным затратам. Период охлаждения может быть уменьшен, снижением температуры воздуха (риски замораживания поверхности) или увеличением скорости воздуха (более высокие эксплуатационные затраты), или одновременным применением двух способов. Чтобы получить более низкие температуры, чем в предыдущих процедурах, иногда холодильные камеры охлаждают заранее (до температуры минус 5–6°C для говядины и минус 10–12°C для свинины), получая преимущества термической инерции, чтобы компенсировать влияние теплого мяса [8].

3.1.2. Иммерсионное охлаждение. Это наиболее старый и наименее дорогой способ охлаждения, который обеспечивает очень быстрое охлаждение без риска замораживания. Иммерсионное охлаждение — это система вне линии, которая не позволяет автоматизировать взвешивание до и после охлаждения, и обычно используется в США для охлаждения тушек птицы. Аппараты для иммерсионного охлаждения занимают небольшую площадь и обычно очень энергоэффективны. Процесс может быть осуществлен, используя водопроводную воду с добавлением или без добавления чешуйчатого льда или предварительно охлажденную воду для создания более низких температур иммерсионных ванн. Такая система способна понизить температуру водопроводной воды до 1°C. Данный процесс может привести к увеличению массы продукта до 12 % в результате контролируемой абсорбции воды.

3.1.3. Охлаждение орошением. Это альтернативный иммерсионному охлаждению метод, который все чаще используется, в США для охлаждения тушек птицы. Охлаждение орошением может быть применено при переработке и производстве «замороженных продук-

тов» или «птиц интенсивной шпарки», а также «свежих продуктов» или «птиц мягкой шпарки». Этот метод охлаждения основан на комбинации прерывистого распыления холодной воды и потока холодного воздуха по всей поверхности продукта (начальный этап охлаждения) и использование только потока воздуха (финишная часть охлаждения). При его использовании не происходит высыхание поверхности туш, ускоряется процесс охлаждения, сохраняется цвет мяса. Как правило, камеры (туннели) охлаждения с распылителями разработаны специально для обработки тушек птиц расположенных в один слой, для предотвращения перекрестной контаминации. Возможно расположение и в два слоя, но в этом случае нижний слой должен быть размещен таким образом, чтобы предотвратить попадание загрязненных капель от тушек верхнего слоя, и для этого требуются дополнительные емкости под сток.

3.1.4. Вакуумное охлаждение. Это быстрый периодический процесс, при которой сырые продукты, содержащие свободную воду, охлаждаются путем испарения воды в условиях вакуума. Преимуществом данной технологии является существенное снижение количеств психрофильных и мезофильных бактерий после хранения мяса в течение нескольких дней. У охлажденного мяса в вакуумной упаковке срок годности значительно дольше, чем у охлажденного мяса в традиционной упаковке. Например, вакуум-упакованные говяжьи отруба могут храниться до 12 недель, в то время как отруба баранины и свинины имеют продолжительность хранения до 5 и 8 недель при хранении при температуре 0°C, соответственно. Недостатком является большие потери массы мяса.

3.2. Холодильная цепь при транспортировке мяса

Для обеспечения стабильного качества и безопасности продукции холодильная цепь должна стабильно поддерживаться о всей цепи транспортировки мяса до конечного потребителя — оптового холодильного хранения или холодильной витрины предприятия розничной торговли. При этом холодильные камеры, оборудованные в специальном транспорте или в кузове грузовика, имеют различные особенности и производительность. Их размер, начальная температура отгружаемого мяса, время достижения рекомендуемой температуры во время транспортировки, конструктивные особенности (например, мощность компрессоров, вентиляции и изоляции), а также вопросы энергозатрат — являются приоритетными при транспортировке мяса [8]. В целом, транспортные средства должны быть оснащены необходимым холодильным оборудованием и системами охлаждения, способных поддерживать нужный температурный режим для мяса и субпродуктов в течение всего времени транспортирования (3. 1.).

3.3. Холодильная цепь в розничной торговле

Поддержание холодильной цепи во время размещения в холодильной витрине розничной торговли имеет огромное значение для предотвращения микробиологической порчи, а также для поддержания свежести и безопасности мяса. Размер и производительность холодильных камер на предприятиях розничной торговли, размер помещений, исходная температура поступающего мяса, процедура обработки мяса (разделка, измельчение), температура окружающей среды, расположение холодильного оборудования, вентиляция и свет — это все возможные слабые точки, на которые необходимо обращать внимание. Особое внимание необходимо уделять температуре при комплектовании/расформировании партий во время переработки мяса (например, ежедневное перемещение мясных отрубов из холодильных камер до витрины розничной торговли и наоборот (при этом, температура внутри кусков мяса должна быть постоянно меньше чем 7°C). Управленческий подход, который доминирует на мясном рынке связан с принципом «первый поступил- первый отправлен». Однако такой подход также должен применяться на всех стадиях холодильной цепи (Рис. 1), и он может быть достигнут с помощью правильно разработанных регламентов перемещения продукции в холодильных камерах хранения мяса и мясных продуктов и витринах розничной торговли. В целом, все точки в цепи транспортировки от холодильного хранения на скотобойне до предприятия розничной торговли, а затем до холодильника потребителя являются критическими точками для общего качества и безопасности мяса.

4. Доступные варианты управления холодильной цепью при поставках мяса

Как было сказано, если холодильная цепь нарушается, то возникает ряд проблем, связанных с качеством мясных продуктов и продуктов из мяса птицы, как например, усушка, гниение, потери при зачистке, неприятный запах, изменения цвета и текстуры, а также усугубленные риски для здоровья со стороны таких патогенов как *Salmonella*, *Campylobacter*, вырабатывающие шига-токсин *E. coli* (STEC) и *Listeria monocytogenes*. Несмотря на многочисленные исследования, нацеленные на лучшее понимание микробной экологии микроорганизмов в мясе (микроорганизмы, вызывающие порчу и пищевые патогены) и ее взаимоотношения с температурой/временем в сложной цепи поставок мяса (например, хранение мяса, транспортировка, дистрибуция и розничная торговля), поддержание холодильной цепи, а также качество и безопасность мяса все еще остаются проблемой. На сегодняшний день, существует несколько вариантов/мер контроля, которые могут быть эффективно и синергетически применены для улучшения контроля в «классической» холодильной цепи поставок мяса.

4.1. Комбинации хранения в охлажденном и замороженном виде

В течение предыдущих двух десятилетий были проведены многочисленные исследования для оценки увеличения продолжительности хранения, а также улучшения качества и безопасности мяса, достигаемых с помощью режимов охлаждения и замораживания. Однако, следует отметить, что было проведено ограниченное количество исследований по оценке комбинированных практик холодильного и морозильного хранения, особенно в отношении длительного холодильного хранения, а затем морозильного хранения с общей продолжительностью свыше 3–4 мес.

По всей вероятности, продолжительное холодильное хранение в вакуум-упакованном виде (две недели для говядины и баранины при 4 °C и даже до 30 недель для говядины при –0,5 °C и 7 недель для баранины при –1,5 °C) в комбинации с последующим морозильным хранением (до одного года при –18 °C) оказывает благоприятное влияние на параметры качества (усилие среза, нежность, влагоудерживающую способность, флейвор и цвет) мяса; улучшенная нежность была подтверждена как основное достижение [15, 19, 20]. Очевидно, что пролонгированное комбинированное холодильное/морозильное хранение может обладать благоприятным эффектом для экспорта мяса. Необходимы дальнейшие и более глубокие исследования для изучения цветовых характеристик и микробиологического профиля охлажденного, а затем замороженного мяса, так как эти исследования тесно связаны с доверием потребителя и вопросами здоровья [20].

4.2. Суперохлаждение

Суперохлаждение используется для обеспечения сохранности пищевых продуктов путем их обработки, при которой температура пищевого продукта снижена на 1–2 °C ниже исходной точки замерзания (для большинства продуктов между 0,5 °C и 2,8 °C). Технология суперохлаждения является комбинацией благоприятного эффекта низких температур с превращением некоторого количества воды в лед, что является недостатком из-за ухудшения качества. Суперохлаждение обеспечивает пищевой продукт внутренним льдом, так что нет необходимости во внешнем льде вокруг продукта во время транспортировки или хранения в течение более коротких периодов времени. В общем, суперохлаждение позиционируется между замораживанием и охлаждением (традиционное охлаждение), где температура окружающей среды устанавливается ниже исходной точки замерзания. Хранение пищевого продукта при температурах суперохлаждения имеет три основных преимущества: поддержание свежести и обеспечение высокого качества пищевого продукта, а также подавление роста вредных микроорганизмов. Кроме того, оно может снизить применение замора-

живания/размораживания и, таким образом, увеличить выход, снизить энергию, трудовые затраты и затраты на транспортировку [21].

4.3. Ионизирующее излучение

Обработка пищевых при помощи ионизирующего излучения обладает рядом положительных эффектов, имеет благоприятное воздействие, которые не может быть достигнуто другими способами и, в частности, традиционными методами, такими как например охлаждение. Облучение пищевых продуктов, применяемое при низкой дозе (до 1 кГр) может быть очень эффективным против паразитов, присутствующих в красном мясе, а также для инактивации патогенных и вызывающих порчу бактерий в охлажденном и/или замороженном мясе и птице.

С другой стороны, с самого начала несколько общественных организаций по защите прав потребителей выражали обеспокоенность в отношении безопасности облученных продуктов для потребления. Однако после более 100 лет исследований, возникшие вопросы разрешены, и потребители принимают облученные пищевые продукты там, где они доступны с понятным объяснением этой новой технологии. Например, в Китае, имеют свою долю рынка фирменные блюда — маринованные куриные ножки (обработанные излучением). В ЕС количество облученных пищевых продуктов на рынке и существенно отличается от США. Последние исследования в ЕС по опросу потребителей в отношении употребления облученных пищевых продуктов на данный момент не доступны. Использование ионизирующего излучения при переработке пищевых продуктов все еще остается недооцененной и недостаточно используемой технологией, несмотря на большой потенциал [22].

4.4. Биоконсервирование

Натуральные компоненты, такие как эфирные масла, низин, лизоцим, а также естественная или контролируемая микробиота, например, молочнокислые бактерии (МКБ) и их антимикробные продукты, такие как молочная кислота и бактериоцины, также были исследованы для увеличения срока хранения мяса и мясных продуктов, и для получения продуктов с «зеленой этикеткой». Например, низин является единственным коммерчески доступным бактериоцином и показал хорошее антибактериальное действие в искусственно контаминированной свинине, а в комбинации с 2% хлоридом натрия превосходный противостерийный эффект в говяжьем фарше; пентоцин 31–1 (вырабатываемый *Lactobacillus pentosus* 31–1, который был выделен из традиционного китайского ферментированного окорока Xuanwei) эффективно ингибировал азот летучих оснований (АЛО) и подавлял рост индигенной микробиоты, особенно *Listeria* и *Pseudomonas* в свинине при холодильном хранении [16].

4.5. Высокое гидростатическое давление (ННР)

Процесс сохранения мяса с использованием высокого гидростатического давления (ННР) — нетермической технологии, может инактивировать вызывающие порчу продукта микроорганизмы и ферменты при низких температурах без существенного изменения органолептических или пищевых характеристик продукта; нежность даже улучшается, в то время как цвет сырого мяса несколько изменяется после обработки ННР. ННР также является мощным средством контроля рисков, ассоциированных с *Salmonella* и *Listeriamonocytogenes* в сырых или маринованных мясных продуктах [23]. Обработка давлением обычно производится в цилиндрах из нержавеющей стали, которые содержат передающую давление среду, например, воду, в то время как продукт защищен от прямого контакта с помощью применения герметичной пластичной упаковки [16]. Рекомендуемая комбинация давления/времени для мяса и мясных продуктов (600–700 МПа в течение 2–5 мин.) показала быструю инактивацию *L. monocytogenes*, а также другой индигенной микробиоты [24].

4.6. Активная упаковка

Активная упаковка — это инновационная технология, которая позволяет взаимодействовать продукту и его окружающей средой для увеличения срока хранения продукта и обеспечения его микробиологической безопасности, при поддержании качества упакованного пищевого продукта. В соответствии, с законодательством ЕС, активная упаковка — это тип упаковки с дополнительной функцией, помимо обеспечения защитного барьера против внешнего влияния. Это означает, что химические вещества, полученные из пищевого продукта и окружающей среды могут абсорбироваться в упаковку, или сама упаковка выделяет вещества в пищевой продукт или окружающую среду, например, консерванты, антиоксиданты и вкусо-ароматические вещества [25]. Существует три основных типа активной упаковки, которые были разработаны к настоящему времени: антимикробная активная упаковка, антиоксидантная активная упаковка, выделяющая/генерирующая диоксид углерода упаковка.

4.6.1. Антимикробная активная упаковка. Это одна из наиболее важных концепций активной упаковки мяса. Существуют четыре основных категории антимикробной упаковки: (i) внесение антимикробных веществ в мягкую подложку внутри упаковки для обеспечения медленного высвобождения антимикробных веществ, (ii) прямое введение антимикробных агентов в упаковочную пленку путем тепловой обработки (ко-экструзия упаковочных пленок с антимикробными веществами), таким образом, что антимикробные вещества могут постепенно высвобождаться из упаковочных пленок в свободное от

продукта пространство в упаковке или на поверхность продукта, (iii) покрытие упаковки матрицей, которая действует как носитель для антимикробных агентов, так чтобы выделить антимикробных веществ на поверхность пищевого продукта через испарение в свободное от продукта пространство (летучие вещества) или миграцию в пищевой продукт через диффузию (нелетучие вещества) и (iv) использование полимеров, которые обладают антимикробной активностью (например, хитозан, поли-L-лизин). Кроме того, были проведены исследования большого количества антимикробных веществ для ингибирования роста микроорганизмов в пищевых продуктах, например, этанол, диоксид углерода, ионы серебра, диоксид хлора, антибиотики, бактериоцины, органические кислоты, эфирные масла, специи, растительные экстракты (розмарин), пептиды и т. д. [26].

4.6.2. Антиоксидантная активная упаковка. Высокие уровни кислорода в упаковке мяса могут способствовать росту микроорганизмов, окислению липидов, образованию постороннего флейвора и запаха, изменению цвета и потерям питательных веществ. Таким образом, контроль уровня кислорода в упаковке мяса очень важен для предотвращения ухудшения качества и порчи мяса. Системы антиоксидантной активной упаковки могут быть подразделены на 2 группы: (i) независимые антиоксидантные приспособления (саше, мягкие подложки или этикетки с поглотителями кислорода — мелкий порошок железа и оксид железа) и (ii) антиоксидантные упаковочные материалы (антиоксидантные активные агенты вводятся в стенки упаковочной пленки (например, терпеноиды из прополиса).

4.6.3. Упаковка, выделяющая диоксид углерода. Диоксид углерода обладает доказанным ингибирующим эффектом в отношении ряда аэробных бактерий и грибов при пониженном содержании кислорода и прямого антимикробного эффекта (путем удлинения лаг-фазы и времени генерации во время логарифмической фазы роста микроорганизмов). Таким образом, генерирующая CO₂ упаковочная система — это метод, дополняющий поглощение кислорода. Уровни CO₂, применяемые для сохранения красного мяса и мяса птицы, относительно высокие (10–80 %). Например, для ингибирования *Pseudomonas* необходимо 10–20 % CO₂, в то время как для контроля пролиферации *C. perfringens*, *C. botulinum* и *Listeriamonocytogenes* нужно 50 % CO₂.

4.7. Беспроводные сенсоры

Производители в пищевой промышленности часто сталкиваются с дилеммой относительно типа управления холодильной цепью при поставках пищевых продуктов до розничной торговли или конечных потребителей, стараясь выбрать между хранением в замороженном состоянии или холодильным хранением

(охлаждение, замораживание, поставка и хранение). Температура — это основной параметр после процесса переработки в определении продолжительности хранения в холодильной цепи охлажденных или замороженных пищевых продуктов. Хранение в замороженном состоянии требует больших энергетических затрат для сохранения пищевых продуктов, в то время при холодильном хранении существует постоянная угроза порчи, вызванной бактериями. Современное управление холодильной цепью включает контроль и регулирование температуры и сфокусирован на простой логистической цепи, а не на обработке нескольких каналов. Для преодоления вышеуказанных недостатков разработана система холодильной цепи на основе температурно-временного индикатора (TTI), в которой используются беспроводные сенсоры для сбора температурных данных на протяжении цепи поставок мяса (от холодильного хранения на скотобойне до розничной торговли) и внедряются положения критериев критических контрольных точек (ККТ) на протяжении всего процесса поставок. При строгом контроле температуры, возможен перевод ряда пищевых продуктов с замороженного хранения на охлажденное, для преодоления недостатков, связанных с замороженным хранением (высокоэнергетическое потребление, ухудшение вкуса, ограниченное число продаж). Создаются контрольные диаграммы для контроля каждой точки процесса. Этот подход основан на архитектуре «Интернет вещей» Internet of Things (IoT) и Международном стандарте по безопасности и качеству пищевых продуктов (ISO 22000). IoT является растущей тенденцией из-за сильного влияния в результате развития информационно-коммуникационных технологий (ICT), например, бирки радиочастотной идентификации животных и пищевой продукции (RFID), датчики, исполнительные механизмы и даже интеллектуальные устройства такие как мобильные телефоны [28]. На практике, ожидается, что IoT будет развиваться в таких областях, как беспроводные сенсорные сети с целью сбора контекстуальных данных. В последнее время идет разработка программного обеспечения для расширения сетевых услуг, используя возможности IoT (сеть вещей — Web of Things, WoT). Наконец, также были разработаны новые бизнес модели в пищевой промышленности: (i) холодильная цепь в службах доставки продуктов на дом; (ii) непрямая доставка из магазинов «шаговой доступности»; (iii) прямая доставка из магазинов «шаговой доступности»; (iv) служба комбинатов бортового питания [28].

4.8. База данных холодильной цепи (CCD)

Эффективное управление холодильной цепью может оптимизировать свежесть и безопасность продукта от фермы/скотобойни до конечного по-

требителя. Целенаправленный сбор данных профилей температуры-времени ($t - T$) в системе поставок мяса, а также в пределах определенного модуля стадии холодильной цепи (например, холодильное хранение на скотобойне, транспортировка/доставка, розничная торговля) может служить ценным вкладом для прогнозирования статуса срока годности пищевого продукта. Недавно была разработана сетевая платформа, в рамках европейского проекта ФРИСБИ (<http://frisbee-project.eu>), для сбора данных температурных условий по всей системе поставок охлажденных и замороженных пищевых продуктов. Были собраны данные всех холодильных модулей цепи (промышленность, дистрибьюторы, розничная торговля и потребители), для создания обширной базы данных, включающей более чем 14000 профилей времени/температуры (t/T). Такая платформа может служить ценным инструментом управления холодильной цепью. Компьютерная программа по прогнозированию в холодильной цепи (ССР) на основе базы данных холодильной цепи (CCD) позволяет рассчитывать статус срока хранения на различных этапах холодильной цепи на основе существующих или определенных пользователем программы кинетических данных. Разработанные средства обладают потенциалом проверки модельных сценариев на основе реальных данных холодильной цепи и дают возможность совершенствовать систему и управление холодильной цепью [29].

5. Заключение

Управление холодильной цепью при поставках мяса имеет высокое значение для сохранения безопасности и качества мяса/мясных продуктов. В связи со сложностью глобальной цепи поставок мяса и мясных продуктов, которая нередко бывает достаточно протяженной и связанной с транспортировкой продукта, как в внутри страны, так и при поставках из одной страны в другую, или с одного континента на другой, требует необходимости соблюдать режимы охлаждения и замораживания, отслеживать время и температуру, чтобы потребитель был уверен в свежести данных продуктов и их безопасности. Хотя режимы охлаждения и замораживания эффективны, как и контроль температуры в течении всего периода поставок мяса, это остается постоянной проблемой для промышленности, дистрибьюторов, ритейлеров и потребителей. В настоящее время существует несколько доступных вариантов контроля и управления холодильной цепью, таких как комбинации хранения в охлажденном и замороженном виде, суперохлаждение, ионизирующее излучение, биоконсервирование, высокое гидростатическое давление (ННП), активная упаковка, беспроводные датчики поддерживаемые компьютерной базой данных холодильной цепи (CCD).

1. Introduction

Meat is a perishable product with a short shelf life and therefore short selling times. In contrast to fresh fruit and vegetables, packaged meat has to be declared with a «use by» date [1]. The maintenance of the cold chain is also one of the main principles and basic requirements of European Union (EU) legislation on food hygiene [2]. Raw materials, ingredients, intermediate products and finished products that are likely to support the growth of pathogenic microorganisms and/or spoilage bacteria, are to be kept at temperatures that do not result in a risk to health. The cold chain should not be interrupted at all times along the meat distribution chain [3].

It is known that shelf life of chilled fresh meat can be extended by various packaging solutions, such as vacuum or modified atmosphere packaging (MAP) [4, 5, 6]. However, a freshness of chilled meat is strongly influenced by temperature. Inadequate storage, distribution and retail temperatures can lead to a significant reduction in shelf life and early spoilage of meat and meat products [6].

Healthy animals that are hygienically slaughtered after proper resting and fasting provide a practically aseptic meat. However, during slaughter, evisceration and dressing operations the microbial cross-contamination usually occurs, especially on the surface of meat, via contact with equipment, tools, hands, clothes, objects, etc. Meat is a particularly favorable substrate for the growth of microorganisms due to its chemical composition, e. g. rich in proteins, lipids and water. The lipid content of meat also makes it very sensitive to oxidation (the reaction of oxygen with fatty acids) and subsequent production of peroxides. The breakdown products of the peroxides produce the characteristic objectionable odor and flavor of rancid meat.

Several weak points exist in meat cold chain, such as the chilling of products during storage — before shipping, temperature abuse during transport and transferring products from one actor to another and waiting times during consolidation and deconsolidation at retail [7, 8, 9]. Temperature abuses result in variations of product quality during distribution and at the end of shelf life and may cause spoilage before the use by date is reached, leading to food waste and economical losses. The vulnerability of meat cold chain became very important in modern, global meat trade where distribution chain is sometimes very complex and long (slaughterhouse-transportation/distribution-re-

tail-consumer continuum), where meat has to be shipped from one to another country or from one to another continent (Figure 1). Therefore, the management of cold chain is of paramount importance and presents a permanent challenge to maintain the safety and freshness of chilled fresh meat until it reaches the final consumer.

2. Meat spoilage

Pork, beef, lamb and poultry carcasses are chilled immediately after *post-mortem* inspection at slaughter line and/or in slaughterhouse chilling rooms. The chilling process is aerobic as the carcasses are exposed to air circulation. Most often, after 24–96h of chilling, the carcasses are usually moved to a boning/cutting room where they are further cut into primary cuts (primals). The primals can be typically stored up to 6 weeks in vacuum packs under anaerobic conditions [3]. Ground meat products may be prepared from trimmings from deboning and/or trimmings from primals after 6 weeks of anaerobic storage; these may be stored aerobically or anaerobically (Figure 2).

It is well known that chilling of red meat and poultry carcasses is essential to retard bacterial growth. Chilling is also required for appearance and eating quality of meat. Most frequently bovine, pork and lamb carcasses are chilled using a forced convection of chilled air [10], although spray chilling (application of a fine spray) may also be used since it is faster than air chilling and it is primarily used in poultry, but may be also used in beef, pork and lamb processing plants.

According to Regulation (EC) 853/2004/EC the carcasses should be immediately chilled after post-mortem inspection to ensure that the temperature throughout the meat (carcass) is lower than 7°C, and lower than 3°C for offal. Interestingly, the provision on time limit by when this temperature must be achieved, is not defined. For example, beef and lamb carcasses are usually not chilled to the temperature lower than 10°C (core temperature) within the first 10 h, to avoid cold shortening and toughening of the meat. Therefore, such conditions are favorable for the bacterial growth on the surface of the carcass, until the temperature is sufficiently reduced to retard bacterial activity [3].

Meat is considered to be spoiled when certain sensory changes occur, e. g. discoloration, off-odor and/or slime development and is usually primarily triggered by spoilage bacteria (Table 1) although indigenous enzymes may

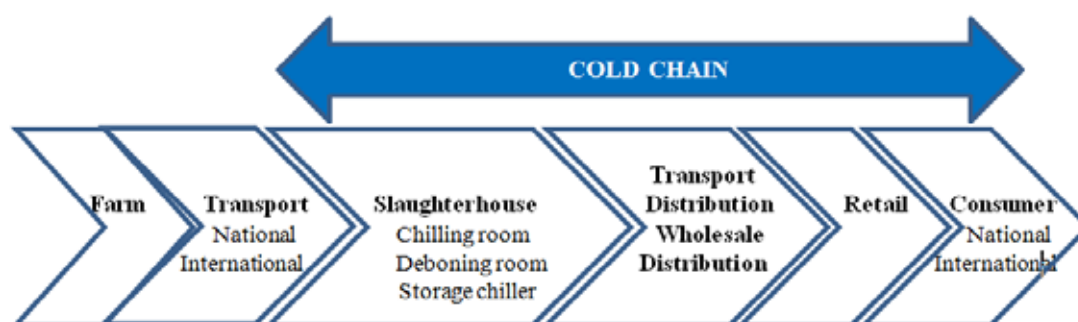


Figure 1. The schematic layout of meat supply cold chain

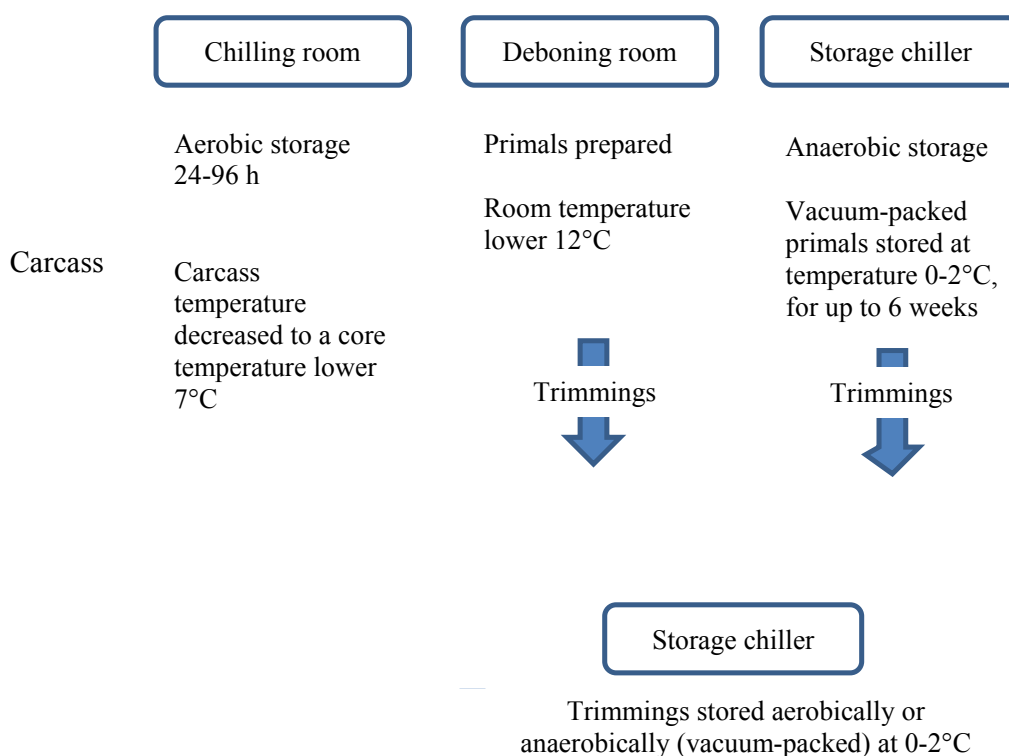


Figure 2. The chilling and chilled storage conditions for beef, pork and lamb carcasses and their primals and trimmings (adapted from [3])

also be involved [11]. For instance *Pseudomonads*, *Lactobacillus* and *Enterococcus* produce slime on meat, while *Enterococcus* produce hydrogen peroxide greening spots, similar to greening caused by *Clostridium* spp. The growth of bacteria on meat surface is influenced by temperature, pH, water activity, nutrient availability, storage atmosphere (aerobic or anaerobic) and competition with other microbiota present on meat [12].

3. Meat supply cold chain management

Preservation of red and poultry meat for trade and export purposes as anaerobic vacuum-packed product in either chilled or frozen form at sufficiently cold temperatures is essential for successful national and international trade [13]. The impact of long-term chilled storage, as well as frozen storage for export purposes was thoroughly investigated [12, 14]. It was proved that frozen storage durations were extended for more than one year [15]. In spite of these advances, improvement of preservation technologies within the current export cold chain remains an issue, in particular at industrial level, with potential for advance-

ments encompassing superchilling, ionizing radiation, biopreservation and high hydrostatic pressure or high pressure processing (HPP) [16].

3.1. Cold chain in slaughterhouse

In slaughterhouse the meat chill chain starts with two main steps: (a) the primary chilling (rapid cooling of meat carcasses after slaughter) so that the warmest point of the carcass (center of the hind leg) has to reach a temperature lower than 7°C and 3°C for edible offal and lower than 4°C for poultry carcasses, to prevent microbial growth and extend the shelf life; with current technology these temperatures can be arrived at in 16–24 hours in small carcasses (lamb), in less than 48 hours in large carcasses (beef, pork) and less than 2h for poultry carcasses (internal deep breast); average and surface temperatures are obviously much lower, reaching 0°C on the surface within four hours; this is very important to slow microbial proliferation; and (b) secondary chilling (maintenance of the meat temperature below 7°C (red meat) and below 4°C (poultry

Table 1. The overview of the main meat/meat products spoilage defects and causal bacteria (adapted from [8]).

Defect	Meat/Meat product	Causal bacteria
Slime	Fresh meat	<i>Pseudomonads</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Weissella</i> , <i>Brochothrix</i>
Hydrogen peroxide greening	Fresh meat	<i>Weissella</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i>
Hydrogen sulfide production	Cured meats	<i>Vibrio</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>
Sulfide odour	Vacuum-packed fresh meat	<i>Clostridium</i> , <i>Hafnia</i>
Cabbage odour	Bacon	<i>Providencia</i>
Cheesy or dairy odour	Vacuum-packed fresh meat	<i>Brochothrixthermosphacta</i>
Putrefaction	Ham	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Proteus</i>
Bone taint	Whole meats	<i>Clostridium</i> , <i>Enterococcus</i>
Souring	Vacuum-packed meats	<i>Lactic acid bacteria</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i>

meat) at all times during chill storage, cutting, deboning, mincing), before transportation.

The most common technologies to chill meat before transportation are: (i) air chilling, (ii) immersion chilling, (iii) spray chilling, and (iv) vacuum chilling [8].

3.1.1. Air chilling. The effectiveness of air chilling applications depends on a number of factors including air temperature and velocity, relative humidity, weight, fat cover of carcasses and loading of chilling chamber. Air temperature must be within the region of 0 °C, with no decrease below minus 1 °C, which could freeze the meat surface and impair its appearance. Air speed can range from 0.25 to 3.0 m/s. However, for economic reasons the most common speeds in use are from 0.75 to 1.5 m/s in the empty section of the cold chamber. Relative humidity during the chilling operation should be kept high to prevent excessive weight loss. The recommended rate is between 90 and 95 %, though this is the most difficult factor to control. It is worth of note that sometimes quick chilling has its problems because of the «cold shortening». Cold shortening can often be seen in beef and mutton, when the meat, still in its pre-rigor phase, reaches temperatures of 10 °C or lower. These conditions cause irreversible contractions of the muscle tissue which toughen the meat even after prolonged ripening. Quick primary chilling also signifies an increase in investment and higher operational costs. The chilling period can be reduced by lowering the air temperature (surface freezing risks) or increasing air speed (higher operational costs) or both. Occasionally cold chambers are refrigerated in advance to reach lower temperatures than those in operation (minus 5–6 °C for beef; minus 10–12 °C for pork), taking advantage of thermal inertia to offset the effect of warm meat loads [8].

3.1.2. Immersion chilling. This is the oldest chilling method and also the least expensive method and provides very rapid cooling with no risk of freezing. Immersion chilling is an off-line system that does not allow automatic weighing before and after chilling and is commonly used for the chilling of poultry carcasses, predominantly in USA. Immersion chillers use little floor space and are very energy efficient. The process can be accomplished using just tap water with or without flaked ice or pre-chilled water to create lower temperatures in the immersion bath. Such system is capable of lowering the temperature of the tap water to 1 °C. This process can result in product weight increase by means of a controllable water pick-up. An increase of up to 12 % can be achieved.

3.1.3. Spray chilling. This is an alternative method to immersion chilling which has been increasingly used especially in the USA for the chilling of poultry carcasses. Spray chilling can be applied in the processing and production of «frozen products» or «hard scalded birds», as well as «fresh products» or «soft scalded birds». This chilling method is based on combination of sprays and air during the initial stage of the chilling cycle and the use of air for the rest of the chilling period; it uses a cold airflow across the surface

of the product and intermittent spraying with cold water. This system prevents the skin from drying out and speeds up the chilling process. With this technique, the discoloration of the skin, which can occur with hard scalded birds, is prevented. Usually, spray chilling tunnels are designed to take one layer of birds in order to prevent cross contamination. Two layers are possible, but the bottom layer must be positioned in between the lines of the top layer to prevent drip contamination and additional drip troughs are required.

3.1.4. Vacuum chilling. This is a rapid batch process whereby moist products containing free water are cooled by evaporation of moisture under vacuum. The advantage of this technology is that it significantly reduces bacterial counts of psychrophiles and mesophiles after the meat was stored for several days. Vacuum packed chilled meat has significantly longer shelf life compared with conventionally chilled wrapped meat. For instance, vacuum packed beef cuts can be stored for up to 12 weeks, while lamb and pork cuts can have a shelf life for up to 5 and 8 weeks, stored at 0 °C, respectively. The disadvantage is the large weight loss of meats.

3.2. Cold chain in meat distribution

During meat distribution (transportation) route to the final user — wholesale cold storage and/or display at retail, the cold chain must be maintained vigorously. Industrial and/or truck chambers have different characteristics and performances. Its size, initial temperature of incoming meat, targeted temperature during transportation, mechanical characteristics (e. g. power of compressors, ventilation and insulation), as well as energy/cost matters are issues of first priority when considering the meat distribution/transportation [8]. In general, the vehicle must be provided with a good refrigerated system, capable to maintain the required temperature of meat/offal at all times during distribution (see 3.1.).

3.3. Cold chain in meat retail

The maintenance of cold chain during display at retail is of crucial importance for prevention of microbial spoilage, as well as maintenance of meat freshness and safety. The size and capacity of chilling chambers at retail establishment, the size of cabinets, initial temperature of incoming meat, meat handling procedures (cutting, mincing), temperatures of surroundings, location of refrigeration machinery, ventilation and light are the possible weak points to be addressed. The special focus should be put on temperature consolidation/deconsolidation during meat handling (e. g. daily transfer of meat cuts from the chilling chamber to the retail cabinet and vice versa, where internal temperature of meat cuts should be at all times lower than 7 °C). The management approach that dominates in the meat market is related to the principle «First In — First Out». However, such approach should also adhere to all stages of the cold chain

(Figure 1) and has to be achieved through properly designed handling procedures in the chill storage rooms and retail cabinets. In all, different points of transport, from cold storage in slaughterhouse to retail outlet, and then to consumer refrigerator, are critical points for the overall meat quality and safety.

4. Available options in meat supply cold chain management

As said, if the cold supply chain is breached, meat and poultry products will suffer from a range of quality problems such as shrinkage, rotting, trim loss, unpleasant odor, color and texture changes, as well as exacerbated health risks from pathogens such as *Salmonella*, *Campylobacter*, Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) and *Listeria monocytogenes*. Despite a numerous studies targeted to better understanding of meat microbial ecology (spoilage microorganisms and food borne pathogens) and its relation to temperature/time within the complex meat supply chain, e. g. meat storage, transportation, distribution and retail, the maintenance of cold chain, as well as meat quality and safety remains a challenge. From recently, there are several options/control measures which can be effectively and synergistically applied to improve the control over the «classic» meat supply cold chain.

4.1. Chilled and frozen storage combinations

Over the previous two decades a numerous studies had been carried out to assess the enhancement of shelf life, as well as quality and safety of meat achieved by chilling and freezing regimes. However, a limited number of studies were conducted to evaluate combined chilled and frozen storage practices, particularly regarding long-term chilled-then-frozen beyond 3–4 months of total duration.

It appeared that prolonged vacuum-packed chilled storage (two weeks for beef and lamb, at 4°C and even up to 30 weeks for beef, at minus 0.5°C and 7 weeks for lamb, at minus 1.5°C) combined with subsequent frozen storage (up to one year, at minus 18°C) had the beneficial effect to quality parameters (shear force, tenderness, fluid levels, flavor and color) of meat; the improved tenderness was confirmed as a major achievement [15, 19, 20]. Obviously, the prolonged chilled-frozen storage combinations can have a beneficial effect for export of fresh meat. Further and deeper studies are needed to investigate instrumental color and microbial profile of chilled-then-frozen meat, as these studies are highly relevant for consumer approval and health issues [20].

4.2. Superchilling

Superchilling is used for preserving foods by process in which the temperature of a food product is lowered to 1–2°C below the initial freezing point (for most foods between 0.5°C and 2.8°C). The superchilling technology combines the favorable effect of low temperatures with

the conversion of some water into ice, which makes it less available for deteriorative processes. Superchilling gives the food product an internal ice reservoir so that there is no need for external ice around the product during transportation or storage for shorter periods. Generally, superchilling is positioned between freezing and refrigeration (conventional chilling), where the surrounding temperature is set below the initial freezing point. Storing food at superchilling temperature has three major advantages: maintaining food freshness, retaining high food quality and suppressing growth of harmful microbes. It can also reduce the use of freezing/thawing for production and thereby increase yield, reduce energy, labor and transport costs [21].

4.3. Ionizing radiation

Processing of food by ionizing radiation offers a range of beneficial effects, which can't be achieved by other and, in particular, traditional techniques such as chilling alone. Food radiation, if applied at low dose (up to 10 kGy) can be very effective against parasites presented in red meat, as well as for inactivation of spoilage and pathogen bacteria in chilled and/or frozen meat and poultry.

On the other hand, several consumer organizations raised concerns from the beginning whether it would be «safe» to consume irradiated food? However, after more than 100 years of research, the questions raised are resolved and the consumers accept irradiated food where it has become available together with an understandable explanation of the new technology. For example, in China very special items, as pickled chicken feet (irradiated), appear to have a certain market share. In the European Union the amount of irradiated food on the market place is marginal; however, varying drastically between Member States. More recent consumer studies are not available for the EU. The use of ionizing radiation in food processing remains still to be an under-estimated and under-exploited technology, in spite of its great potential [22].

4.4. Biopreservation

Natural compounds, such as essential oils, nisin, lysozyme, as well as natural or controlled microbiota, e. g. lactic acid bacteria (LAB) and their antimicrobial products such as lactic acid and bacteriocins, were investigated to extend the shelf life of meat/meat products and to obtain «green label» products. For example, nisin is only commercially available bacteriocin and showed good antibacterial action in artificially contaminated pork and in combination with 2 % sodium chloride an excellent anti-listerial effect in minced beef; pentocin 31–1 (produced by *Lactobacillus pentosus* 31–1 isolated from the traditional Chinese fermented Xuanwei ham) effectively inhibited volatile basic nitrogen (VBN) and suppressed the growth of indigenous microbiota, especially *Listeria* and *Pseudomonas*, in chilled pork storage [16].

4.5. High hydrostatic pressure (HHP)

The meat preservation process using HHP, a non-thermal technology, can effectively inactivate product-spoiling microorganisms and enzymes at low temperatures without changing dramatically the sensory or nutritional characteristics of the product; the tenderness is even improved, while the fresh meat color is slightly changed, after the HHP treatment. HHP is also a powerful tool to control risks associated with *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in raw or marinated meats [23]. Pressure processing is usually carried out in a steel cylinder containing a liquid pressure-transmitting medium, e. g. water, while the product is protected from direct contact by using sealed flexible packaging [16]. The recommended pressure/time combination for meat/meat products of 600–700 MPa for 2–5 minutes showed quick inactivation of *L. monocytogenes*, as well as other indigenous microbiota [24].

4.6. Active packaging

Active packaging is an innovative technology that allows the product and its environment to interact to extend the product shelf life and to ensure its microbial safety, while maintaining the quality of packed food. According to EU legislation, active packaging is a type of food packaging with an extra function, in addition to that of providing a protective barrier against external influence. It means that the packaging can absorb food- and environment-derived chemicals within the packaging surrounding the food or its releases substances into the food or the environment surrounding the food, e. g. preservatives, antioxidants, and flavorings [25]. There are three main types of active packaging which were developed so far: antimicrobial active packaging, antioxidant active packaging, carbon-dioxide emitting/generating packaging.

4.6.1. Antimicrobial active packaging. This is one of the most important concepts of active packaging of meat. There are four basic categories of antimicrobial packaging: (i) incorporation of antimicrobial substances into a pad inside the package, with aim to provide a slow release of antimicrobials, (ii) direct incorporation of the antimicrobial agents into the packaging film, by heat treatment (co-extrusion of packaging films with antimicrobials), so that antimicrobials can be gradually released from the packaging films to the packaging head space or food surface, (iii) coating of packaging with a matrix that acts as a carrier for antimicrobial agents, so to allow the release of antimicrobials onto the food surface through evaporation into the headspace (volatile substances) or migration into the food through diffusion (non-volatile substances), and (iv) use of polymers that have antimicrobial activity (e. g. chitosan, poly-L-lysine). In addition, a large number of antimicrobials were tested for inhibiting the growth of microorganisms in food, e. g. ethanol, carbon dioxide, silver ions, chlorine dioxide, antibiotics, bacteriocins, organic acids, essential oils, spices, plant extracts (rosemary), peptides, etc [26].

4.6.2. Antioxidant active packaging. High levels of oxygen in meat packaging can facilitate microbial growth, lipid oxidation, development of off-flavors and off-odors, color changes and nutritional losses. Therefore, control of oxygen level in meat packaging is important to prevent/retard the deterioration and spoilage of meat. Antioxidant active packaging systems can be classified into 2 groups: (i) independent antioxidant devices (sachets, pads or labels with oxygen scavengers — fine iron powder and ferrous oxide), and (ii) antioxidant packaging materials (antioxidant active agent is incorporated into the walls of the packaging film (e. g. terpenoids from the propolis).

4.6.3. Carbon-dioxide emitting/generating packaging. Carbon dioxide has proven inhibitory effect for a range of aerobic bacteria and fungi via reduced oxygen level and through direct antimicrobial effect (by prolonging a lag phase and generation time during the logarithmic phase of microbial growth). Therefore, a CO₂ generating packaging system is a technique complementary to oxygen scavenging. The levels of CO₂ applied for meat and poultry preservation are relatively high (10–80 %). For example 10–20 % of CO₂ is needed for the inhibition of *Pseudomonas*, while 50 % of CO₂ is necessary for control of proliferation of *C. perfringens*, *C. botulinum* and *Listeria monocytogenes*.

4.7. Wireless sensors

The manufacturers in the food industry frequently face the dilemma regarding the type of cold chain management in delivering products to retailers or end consumers, having to choose between frozen storage and cool storage (cooling, freezing, delivering and storage). Temperature is the main post-processing parameter in the determination of shelf-life in a cold chain of chilled and frozen food products. Frozen storage includes high-energy consumption for the preservation of food products, whereas cool storage involves the constant threat of bacterial-induced spoilage. Contemporary cold chain management encompasses temperature control and is focused on single logistic chain rather than serving multiple channels. In order to overcome the aforementioned deficiency, a time-temperature indicator (TTI) based cold-chain system is developed, which uses wireless sensors for collecting temperature data along the meat supply chain (from cold storage in slaughterhouse to retail) and implements the formulation of Critical Control Point (CCP) criteria throughout the entire delivery process. Under strict temperature monitoring, switching a number of products from frozen storage to cool storage seems to be feasible to improve the shortcomings associated with frozen storage (high-energy consumption, deterioration of taste, limited number of sale channels). Control charts are formulated for monitoring each point in the process. This approach is based on Internet of Things (IoT) architecture and international food standard (ISO 22000). IoT is a growing trend with a powerful influence in shaping the development of the in-

formation and communication technology (ICT) sector, e. g. radio frequency identification (RFID) tags, sensors, actuators, and even smart devices like mobile phones [27]. In practice, the IoT is expected to develop in areas such as wireless sensor networks with the aim of collecting contextual data. Further, a software approach to expanding web-based services using the capabilities of IoT (Web of Things, WoT) were recently developed. Lastly, a new business models in the food industry have been also developed: (i) cold chain home delivery service; (ii) convenience store (CVS) indirect delivery; (iii) CVS direct delivery; (iv) flight kitchen service [28].

4.8. Cold chain database (CCD)

The effective cold chain management can optimize freshness and safety of the product from farm/slaughterhouse up to the final consumer. The targeted data acquisition of time-temperature ($t - T$) profiles along the meat supply chain, as well as within the specific module of the cold chain stage (e. g. cold storage in slaughterhouse, transportation/delivery, retail) can serve as a valuable input for prediction of a product shelf-life status. From recently, a web-based platform was developed, within FRISBEE European project (<http://frisbee-project.eu>), for temperature conditions data collection throughout the chilled and frozen food supply chain. Data including all cold chain modules (industry, distributors, retailers and consumers), were collected to create the extensive database comprising more than 14, 000 time/Temperature (t/T) profiles. Such platform can serve as a valuable Cold Chain Management tool.

The Cold Chain Predictor (CCP) software based on the Cold Chain Database (CCD) allows calculation of product shelf-life status at different cold chain stages based on existing or user defined kinetic data. The developed tools offer the potential to run simulation scenarios based on real cold chain data and contribute to effective cold chain improvement and management [29].

5. Conclusion

The cold chain management in meat supply is of utmost importance for the maintenance of quality and safety of meat/meat products. The complexity of global meat supply chain, with frequently long distribution chains associated with transportation of the product within one country, from one to another country, and from one to another continent, makes the solutions for the chilling and freezing regimes, as well as monitoring of time-temperature profiles, very important for the overall success in delivery of product. These products should be then accepted by consumer for its freshness and safety levels. Although the importance of chilling and freezing regime effectiveness and temperature monitoring along the meat supply chain are well known, it remains a permanent challenge for the industry, distributors, retailers and consumers. From recently, there are several available options for control and management of the cold chain, such as chilled and frozen storage combinations, superchilling, ionizing radiation, biopreservation, high hydrostatic pressure (HHP), active packaging, wireless sensors, supported with the software-based cold chain database (CCD).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК/ REFERENCES

1. The European Parliament and the Council. (2011). Regulation (EU) No 1169/2011 of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers. *Official Journal of the European Union*, OJ (L 304), 18–63.
2. Regulation (EC) 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004, laying down specific hygiene rules for on the hygiene of foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, OJ (L 304), L139/55.
3. EFSA (2016). Growth of spoilage bacteria during storage and transport of meat. *Official Journal of the European Union*, 14 (6), 4523.
4. Lambert, A. D., Smith, J. P., Dodds, K. L. (1991). Shelf life extension and microbiological safety of freshmeat — a review. *Food Microbiology*, 8 (4), 267–297.
5. Kiermeier, A., Tamplin, M., May, D., Holds, G., Williams, M., Dann, A. (2013). Microbial growth, communities and sensory characteristics of vacuum and modified atmosphere packaged lamb shoulders. *Food Microbiology*, 36 (2), 305–315.
6. Berruga, M. I., Vergara, H., Gallego, L. (2005). Influence of packaging conditions on microbial and lipid oxidation in lamb meat. *Small Ruminant Research*, 57 (2–3), 257–264.
7. Raab, V., Petersen, B., Kreyenschmidt, J. (2011). Temperature monitoring in meat supply chains. *British Food Journal*, 113 (10), 1267–1289.
8. Nychas, G. E., Skandamis, P. N., Tassou, C. C., Koutsoumanis, K. P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, 78 (1–2), 77–89.
9. Olsson, A. (2004). Temperature controlled supply chains call for improved knowledge and shared responsibilities. In *Conf. Proc. NOFOMA 2004* (ed. H. Aronsson), 569–582. Sweden: Linköping.
10. James, S. J., James, C. (2004). Meat marketing (d) transport of meat and meat products. In: Jensen, W. K., Devine, C. Dikeman, M. (eds.). *Encyclopedia of Meat Sciences*. Academic Press, Elsevier Science, Ltd. 696–702.
11. Tsigarida, E., Nychas, G. — J. E. (2001). Ecophysiological attributes of a *Lactobacillus* spp. and a *Pseudomonas* spp. on sterile beef fillets in relation to storage temperature and film permeability. *Journal of Applied Microbiology*, 90 (5), 696–705.
12. Sumner, J., Jenson, I. (2011). The effect of storage temperature on shelf life of vacuum-packed lamb shoulders. *Food Australia*, 63 (6), 249–251.
13. Deards, B., Leith, R., Mifsud, C., Murray, C., Martin, P., Gleeson, T. (2014). Live export trade assessment. Canberra: Department of Agriculture. [Electronic resource: <http://www.herefordsaustalia.com.au/Portals/0/PDF/ABARES%20Live%20Export%20Trade%20Assessment.pdf>. Access date 30. 06. 2017]
14. Kiermeier, A., Tamplin, M., May, D., Holds, G., Williams, M., Dann, A. (2013). Microbial growth, communities, and sensory characteristics of vacuum and modified atmosphere packaged lamb shoulders. *Food Microbiology*, 36 (2), 305–315.
15. Muela, E., Monge, P., Safiudo, C., Campo, M. M., Beltran, J. A. (2015). Meat quality of lamb frozen stored up to 21 months: instrumental analysis on thawed meat during display. *Meat Science*, 102, 35–40.
16. Zhou, G. H., Xu, X. L., Liu, Y. (2010). Preservation technologies for fresh meat — A review. *Meat Science*, 86(1), 119–28.
17. UN FAO, (1991). Manual on meat cold storage operation and management. [Electronic resource: <http://www.fao.org/docrep/004/T0098E/T0098E02.htm>. Access date 29.06.2017].
18. Hagyard, C. J., Keiller, A. H., Cummings, T. L., Chrystall, B. B. (1993). Frozen storage conditions and rancid flavor development in lamb. *Meat Science*, 35 (2), 305–312.
19. Muela, E., Monge, P., Sanudo, C., Campo, M. M., Medel, I., Beltran, J. A. (2016). Sensory quality of lamb following long-term frozen storage. *Meat Science*, 114, 32–37.

20. Coombs, C. E. O., Holman, B. W. B., Friend, M. A., Hopkins, D. L. (2017). Long-term red meat preservation using chilled and frozen storage combinations: A review. *Meat Science*, 125, 84–94.
21. Kaale, L. D., Eikevik, T. M., Rustad, T., Kolsake, r K. (2011). Superchilling of food: A review. *Journal of Food Engineering*, 107 (2), 141–146.
22. Ehlermann, D. A. E. (2016). Particular applications of food irradiation: Meat, fish and others. *Radiation Physics and Chemistry*, 129, 53–57.
23. Garriga, M., Grebol, N., Aymerich, M. T., Monfort, J. M., Hugas, M. (2004.) Microbial inactivation after high-pressure processing at 600 MPa in commercial meat products over its shelf life. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5 (4), 451–457.
24. Lucore, L. A., Shellhammer, T. H., Yousef, A. E. (2000). Inactivation of *Listeria monocytogenes* on artificially contaminated frankfurters by high-pressure processing. *Journal of Food Protection*, 63 (5), 662–664.
25. EU. (2009). Guidance to the Commission Regulation (EC) 450/2009 on active and intelligent materials and articles intended to come into contact with food. Version 10. European Commission Health and Consumers Directorate, General Directorate E – Safety of the Food Chain, E6 – Innovation and sustainability.
26. Fang, Z., Zhao, Y., Warner, R. D., Johnson, S. K. (2017). Active and intelligent packaging in meat industry. *Trends in Food Science and Technology*, 61, 60–71.
27. Kang, Y. S., Lee, Y. H. (2013). Development of generic RFID traceability services. *Computers in Industry*, 64 (5), 609–623.
28. Shih, C. W., Wang, C. H., (2016). Integrating wireless sensor networks with statistical quality control to develop a cold chain system in food industries. *Computer Standards & Interfaces*, 45, 62–78.
29. Gogou, E., Katsaros, G., Derens, E., Alvarez, G., Taoukis, P. S. (2015). Cold chain database development and application as a tool for the cold chain management and food quality evaluation. *International Journal of Refrigeration*, 52, 109–21.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Принадлежность к организации

Настасиевич Иван — адъюнкт-директор, Институт гигиены и технологии мяса.

Kačanskog 13, 11000, Belgrade, Serbia

Тел. : +381-11-2650-722

E-mail: ivan.nastasijevic@inmes.rs

*автор для контактов

Лакичевич Бранкика — Научный сотрудник, Институт гигиены и технологии мяса.

Kačanskog 13, 11000, Belgrade, Serbia

Тел. : +381-11-2650-722

E-mail: brankica.lakicevic@inmes.rs

Петрович Зоран — Научный сотрудник, Институт гигиены и технологии мяса.

Kačanskog 13, 11000, Belgrade, Serbia

Тел. : +381-11-2650-722

E-mail: zoran.petrovic@inmes.rs

Критерии авторства

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.10.2017

AUTHOR INFORMATION

Affiliation

Nastasijevic Ivan — Associate Director, Institute of Meat Hygiene and Technology.

Kačanskog 13, 11000, Belgrade, Serbia

Tel. : +381-11-2650-722

E-mail: ivan.nastasijevic@inmes.rs

*corresponding author

Lakicevic Brankica—Research Associate, Institute of meat hygiene and technology.

Kačanskog 13, 11000, Belgrade, Serbia

Tel. : +381-11-2650-722

E-mail: brankica.lakicevic@inmes.rs

Petrović Zoran — Research Associate, Institute of meat hygiene and technology.

Kačanskog 13, 11000, Belgrade, Serbia

Tel. : +381-11-2650-722

E-mail: zoran.petrovic@inmes.rs

Contribution

The authors equally contributed to the writing of the manuscript and are equally responsible for plagiarism.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Received 20.10.2017

ИССЛЕДОВАНИЕ ПО СНИЖЕНИЮ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НИТРИТА И НИТРАТА В МЯСНЫХ ПРОДУКТАХ ПРИ ДОБАВЛЕНИИ НАТУРАЛЬНОЙ СОЛИ И МОНООКСИДА УГЛЕРОДА

Саката Р.¹, Такеда С.¹, Вага М.^{1,2}

¹ Институт ветеринарной медицины, Университет Азабу, Сагамихара, Канагава, Япония

² Itoham Foods, Inc., Мэгуро, Токио, Япония

Ключевые слова: цветовая стабильность карбоксимиоглобина, ингредиенты для посола, натуральная соль, нитрат, нитрит

Аннотация

Исследование проводилось с целью изучения изменений цветовых характеристик мясных продуктов за счет добавления натуральной желтой соли (YS) и монооксида углерода (CO). После обработки свинины нитритом натрия в количестве от 0 до 100 ppm, добавляли YS или NaCl в количестве 2% и анализировали оптическим методом изменение цвета. Содержание пигмента гема в мясе также определяли оптическим (спектрофотометрическим) методом. Было обнаружено, что YS приводит к формированию более выраженного красного цвета по сравнению с NaCl, что указывает на то, что содержание остаточного нитрита и нитрата в мясных продуктах, содержащим YS, значительно выше, хотя их количество в YS довольно невысокое. Присутствие нитрита в YS не может объяснить эффект YS при формировании цвета. Поскольку YS содержит не только нитрит, но и нитрат, то исследовали также влияние нитрата на стабильность цвета вареных продуктов из свинины. Нитрат предотвращал снижение концентрации нитрита и потерю цвета вареной соленой ветчины. Было обнаружено, что скорость снижения уровня нитрита уменьшается с увеличением содержания азотной кислоты. Нитрат, по-видимому, не является донором нитрита, и препятствует восстановлению нитрита в вареных мясных продуктах и, следовательно, улучшает стабильность цвета. Нитрат, содержащийся во многих сортах каменной соли, как и в нашем случае, может улучшить формирование цвета. Обработка свинины монооксидом углерода (CO) вызывала образование карбоксимиоглобина (COMb) с последующим формированием красного цвета мяса. Было показано, что COMb стабильно образуется при pH от 5,0 до 8,0, является термоустойчивым, может быть экстрагирован водой, но практически не экстрагируется ацетоном. Также было обнаружено, что оксид азота более тесно связан с миоглобином (Mb), чем CO. Отмечено, что во всех исследуемых мясных продуктах нитрозил-миоглобин является стабильным. Показано также, что монооксид углерода может влиять на степень окисления липидов.

Original scientific paper

STUDY ON DECREASE OF NITRITE AND NITRATE USAGE IN PROCESSED MEAT WITH ADDITION OF NATURAL SALT AND CARBON MONOXIDE

Sakata R.,¹ Takeda S.,¹ Waga M.^{1,2}

¹ School of Veterinary Medicine, Azabu University, Sagami-hara, Kanagawa, Japan

² Itoham Foods, Inc., Meguro, Tokyo, Japan

Keywords: carboxyl myoglobin color stability, curing agent, natural salt, nitrate, nitrite

Abstract

This study was carried out to examine the reddening of meat products due to the addition of natural yellow salt (YS) and carbon monoxide (CO). Following YS or NaCl addition at 2% to pork subsequent to nitrite (0~100 ppm) treatment, color development due to this addition was analyzed optically. Heme pigment content in the meat was also determined spectrophotometrically. YS was found to bring about greater reddening than NaCl, indicating residual nitrite and nitrate content to be significantly higher in meat containing YS, through the amount of either was quite small. The nitrite itself in YS could never explain the color formation by the YS. Because the YS included not only nitrite but also nitrate, the effects of nitrate on the color stability of cooked cured pork were examined. Nitrate inhibited the nitrite decrement and discoloration in the cooked cured ham. The degradation rate of nitrite was clearly found to decrease with nitric acid content. Nitrate does not appear to serve as a donor of nitrite, but rather inhibits nitrite reduction in cooked meat products, with consequent prolongation of color stability. Nitrate, observed in many rock salt and also in this case, could enhance the color formation. CO treatment of pork caused the formation of carboxy myoglobin (COMb) with consequent

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Саката Р., Такеда С., Вага М. Исследование по снижению использования нитрита и нитрата в мясных продуктах при добавлении натуральной соли и монооксида углерода. Теория и практика переработки мяса. 2017;2(4):35-43. DOI:10.21323/2414-438X-2017-2-4-35-43

FOR CITATION: Sakata R., Takeda S., Waga M. Study on decrease of nitrite and nitrate usage in processed meat with addition of natural salt and carbon monoxide. Theory and practice of meat processing. 2017;2(4):35-43. (In Russ.) DOI:10.21323/2414-438X-2017-2-4-35-43

reddening of the meat. COMb was shown to be heat-stable and form stably at pH 5.0 to 8.0 and to be extractable with water, but was barely extractable at all with acetone. Nitric oxide was found to have greater affinity toward myoglobin (Mb) than CO. Nitrosyl Mb was noted to be stable in all meat products examined. CO was seen to be capable of controlling the extent of lipid oxidation.

1. Введение

Цвет мяса является основным фактором, определяющим любое решение о покупке мясного продукта, и уже потом оцениваются такие параметры, как запах, вкус или текстура. Вещества, предназначенные для формирования цвета, такие как нитриты и нитраты, признаны весьма эффективными, но по соображениям безопасности пищевых продуктов степень их использования ограничена.

В ответ на запросы потребителей в настоящее время все больше внимания уделяется безопасности пищевых продуктов. В связи с этим, в настоящее время ведется разработка способов для увеличения интенсивности цветовых характеристик мясных продуктов с использованием как можно меньшего количества нитрита и нитрата, но с применением натуральных компонентов [1, 2]. Как в Японии, так и за рубежом проводят исследования с целью заменить традиционные посолочные компоненты натуральными веществами животного происхождения. Результаты должны подтвердить их эффективность с точки зрения улучшения и сохранения привлекательного внешнего вида продуктов, а также безопасность для здоровья человека.

Однако при проведении исследований были отмечены некоторые проблемы с формированием или потерей красного цвета мясных продуктов, для которых необходимо найти эффективные решения. Ранее сообщалось о влиянии гималайской каменной соли на формирование красного цвета мясных продуктов [3].

В несоленых мясных продуктах основной причиной формирования красного цвета можно считать карбоксимиоглобин (COMb). Монооксид углерода (CO) прочно связывается с миоглобином (Mb) с образованием COMb, который обладает устойчивым ярко-красным цветом. В Японии добавление CO в пищевые продукты запрещено законом, хотя в других странах это соединение применяется для упаковки пищевых продуктов в модифицированной газовой среде, и его использование в мясных продуктах тщательно изучается [4, 5]. Если CO сможет снизить содержание нитрита в мясных продуктах, то его использование не должно столкнуться с возражениями со стороны потребителей.

Натуральные соли, особенно те, что содержатся в гималайских каменных породах, могут оказаться наиболее подходящими для формирования красного цвета мясных продуктов, поскольку они содержат небольшое количество нитрита и нитрата, а также различные минералы. Таким образом, при проведении исследований изучалась желтая соль (YS) из гималайских пород на предмет формирования красного цвета мясных продуктов, и результаты сравнивались с данными, полученными для традиционных посолочных смесей.

В процессе формирования цвета нитрат считается предшественником нитрита ввиду его восстановления посредством бактерий. Alley, Cours и Demeyer [6] показали, что нитрат может стабилизировать цвет мясных продуктов, не прошедших тепловую обработку. Однако Ockerman и Kuo [7] считают, что нитрат замедляет снижение уровня нитрита в вареных соленых мясных продуктах. Различия в выводах этих исследователей могут объясняться наличием или отсутствием аскорбата натрия.

Целью настоящего исследования является определение степени восстановления нитрата после тепловой обработки мясных продуктов, а также влияние его содержания на кинетику изменений уровня нитрита в процессе хранения вареной свинины.

Кроме того, были исследованы некоторые свойства CO, такие как его прочное связывание с Mb, приводящее к формированию привлекательного красного цвета мяса. Было проведено сравнение таких параметров, как термостабильность, экстрагируемость и образование COMb при различных значениях pH. Затем производные Mb подвергались спектрофотометрическому исследованию после введения CO в нитрозил-миоглобин (NOMb). Также были исследованы антиоксидантные эффекты CO в мясных продуктах.

2. Материалы и методы

2.1. Эксперимент с натуральными солями

Для проведения эксперимента использовался окорок свиной туши. Мясо окорока было тщательно очищено от жировой и соединительной ткани и измельчено. В каждый образец мяса добавляли YS или NaCl в количестве 2 %, а также 0,1 % аскорбата натрия и NaNO₂ в диапазоне концентраций: 0, 10, 30, 50 или 100 ppm. После 4-дневного хранения при температуре 4 °C в анаэробных условиях измельченные образцы подвергали термообработке при 75 °C в течение 30 минут. Цвет оценивали визуально после охлаждения образца, а затем проводили измерение с помощью спектрального колориметра. (CM-2002, Konica Minolta, Япония).

Коэффициент формирования цвета (CFR) [8] и содержание пигмента гема измеряли с помощью экстракции ацетоном. Содержание остаточного нитрита и нитрата определяли по методу Mirna [9] посредством восстановления в медно-кадмиевой колонке.

2.2. Влияние нитрата на вареные продукты из свинины

Все используемые химикаты относились к стандартному лабораторному классу и были приобретены в компании Wako Pure Chemical Industries (Токио, Япо-

ния). Они использовались без дальнейшей очистки. Для получения опытных продуктов использовались мышцы *Longissimus dorsi* (*L. dorsi*, показатель pH=5,7) и *Biceps femoris* (*B. femoris*, показатель pH=5,8), полученные от 5-месячных самцов свиней (трехпородное скрещивание: ландрас, крупная белая и дюрок).

Опытные образцы вареной колбасы и ветчины готовили из фарша *B. femoris* и цельных кусков *L. dorsi* соответственно. Каждый образец в течение 7 дней подвергался посолу с использованием нитрата (обозначали как «+Нитрат») или без него (Контрольный образец). При посоле образцов, (каждый массой 1500 г) использовали 300 мл рассола, содержащего: 27 г NaCl, 0,248 г NaNO₂ и 0,728 г KNO₃ («+Нитрат») или 27 г NaCl и 0,248 г NaNO₂ (Контроль). Затем каждый образец разделяли на 5 порций массой не выше 300 г и упаковывали под вакуумом. Далее образцы подвергали термообработке в водяной бане при температуре 75 °C в течение 30 минут и хранили при 10 °C с флуоресцентным освещением (2000 люкс).

Цвет и концентрацию нитрита и нитрата контролировали еженедельно в течение 4 недель. Содержание остаточного нитрита измеряли по методу Sakata и Nagata [10]. Концентрацию нитрита в экстракте определяли посредством прохождения экстракта через Cu-Cd колонку (скорость потока — 5 мл/мин). Разница в концентрации нитрита до и после прохождения через колонку представляла собой концентрацию нитрата [11]. Цвет поверхности образцов оценивали посредством показателей L*, a* и b* с использованием колориметра (CM-2002, Konica Minolta, Япония).

Эксперимент проводили *in vitro* с использованием реакционных растворов, полученных смешиванием 2 мл (2-х молярного уксуснокислого буфера (pH = 4,5), 1 мл (0,1-молярного NaNO₂) и 1 мл дистиллированной воды. Соотношение между снижением уровня нитрита и формированием нитрата определяли на основе значений оптической плотности с использованием спектрофотометра (UV-2700, Shimadzu, Япония). Концентрацию нитрата рассчитывали на основе его максимума при длине волны 303 нм. Спектры поглощения нитрита изменялись по мере увеличения или уменьшения показателя pH, так как изменялось содержание нитрита и HNO₂. В связи с этим для определения концентраций нитрита использовали изобестическую точку при длине волны 324 нм для нитрита и HNO₂. Каждый раствор перед использованием выдерживали при температуре 20 °C, а затем после смешивания всех растворов измеряли оптическую плотность при длинах волн 324 нм и 303 нм каждые 20 секунд. Измерения проводили более чем 350 раз.

2.3. Эксперимент с CO

СОМб получали с помощью опытного раствора (0,1% Mb, 0,2% Na₂SO₄, pH=5,5 с введением CO), а затем образцы подвергали термообработке при 70 °C

в течение 20 минут. После этого регистрировали спектры поглощения СОМб при изменении значений pH от 5,0–9,0.

Образцы мяса, полученные из окорока свиной туши, были предварительно обработаны монооксидом углерода (к которому добавили 100 ppm NaNO₂) и подвергнуты посолу. Затем их выдерживали при температуре 2 °C в течение 4 дней. Значение показателя a* измеряли спектрофотометрически (CM-2002, Konica Minolta, Япония). СОМб и НОМб экстрагировали водой или 75 % ацетоном, а спектры поглощения полученных таким образом растворов использовали для определения степени образования СОМб. Окисление липидов в каждом образце мяса также оценивали посредством анализа с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТВА) [12].

Для определения степени образования СОМб измеряли спектры поглощения раствора НОМб (0,1% Mb, 1% аскорбата натрия, 0,1% NaNO₂, pH=5,5), предварительно обработанного СО.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Влияние желтой каменной соли и низкого уровня нитрита и нитрата на цвет мяса

В фарше с добавлением NaCl и без нитрита CFR и показатель a* (краснота) были ниже, чем в образцах фарша с YS. В образцах фарша с YS (с нитритом и без него) краснота мяса и CFR превышали 70 %, несмотря на низкий уровень нитрита в диапазоне от 0 до 100 ppm (Рис. 1).

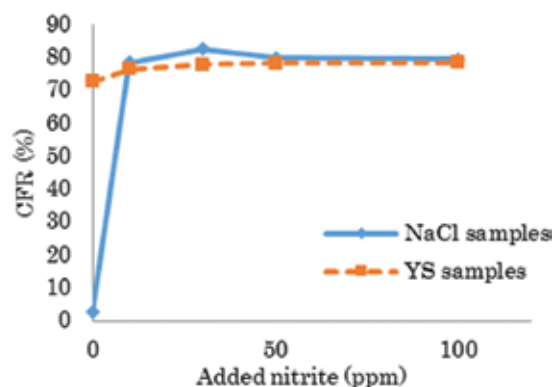


Рис. 1. Коэффициент формирования цвета (CFR)

По сравнению с образцами, содержащими NaCl, уровень остаточного нитрита обычно был выше в фарше с добавлением YS (Рис. 2). Сама YS содержит больше нитрита, чем нитрата. Таким образом, было показано, что YS эффективно улучшает формирование красного цвета мяса. Возможно, этому способствует небольшое количество нитрита, нитрата и минералов в YS.

Было отмечено, что в свином фарше с добавлением YS значение CFR изменяется с увеличением содержания пигмента гема. Когда содержание гема в образцах фарша довольно невысокое, то значение CFR выше, чем

в фарше с большим количеством гема (Рис. 3). Возможно, это происходит из-за ограниченного участия нитро-зирования гема в формировании красного цвета мяса.

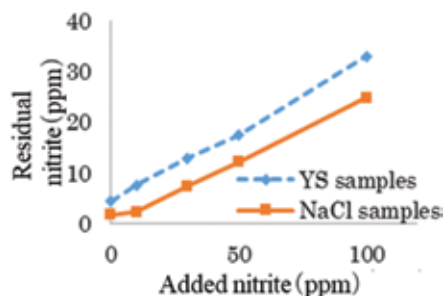


Рис. 2. Остаточные уровни нитрита

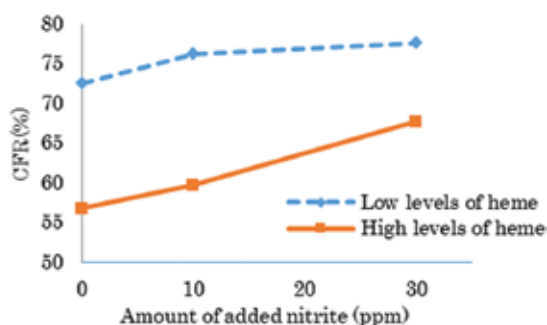


Рис. 3. Коэффициент формирования цвета как функция содержания пигмента гема

3.2. Влияние нитрата на стабильность цвета вареных продуктов из свинины

В течение периода хранения инструментальное значение показателя a^* (краснота) в ветчине, с использованием при посоле нитрита (Контроль), уменьшалось быстрее, чем в ветчине, с использованием при посоле нитрита и нитрата («+Нитрат») (Рис. 4).

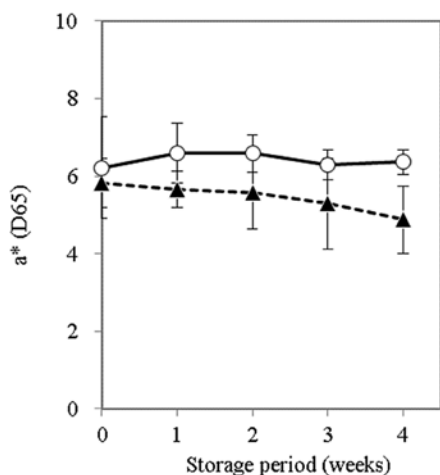


Рис. 4. Влияние нитрата на стабильность цвета в опытных образцах ветчины

Контроль: посол с использованием 1,5% NaCl и 2 мМ NaNO₂; обозначено символом (▲).
+Нитрат: посол с использованием 1,5% NaCl, 2 мМ NaNO₂ и 4 мМ KNO₃; обозначено символом (○).

При экспериментах с ветчиной концентрация остаточного нитрита поддерживалась в течение 3–4 недель с помощью добавления нитрата (Рис. 5). Результаты

этого исследования показывают, что распад нитрита прогрессирует в виде обратимой реакции, как показано выше. Поэтому нитрат предотвращает снижение концентрации остаточного нитрита в вареной соленой свинине. Усиливающее действие нитрата на формирование цвета мяса было ограничено, даже если нитрат добавляли в достаточном количестве. Таким образом, нитрат в YS может улучшать формирование цвета, но на этот процесс влияют и другие вещества, содержащиеся в YS.

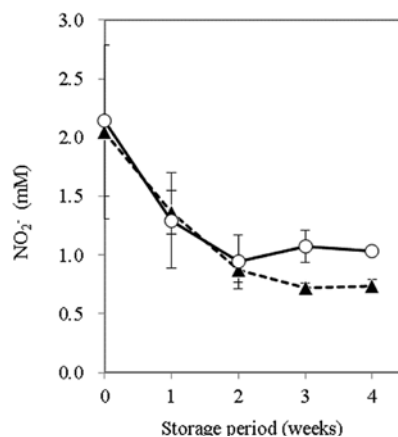


Рис. 5. Влияние нитрата на скорость снижения уровня остаточного нитрита в опытном окороке

Контроль: посол с использованием 1,5% NaCl и 2 мМ NaNO₂; обозначено символом (▲).

+Нитрат: посол с использованием 1,5% NaCl, 2 мМ NaNO₂ и 4 мМ KNO₃; обозначено символом (○).

3.3. Влияние газообразного СО на свойства мяса и формирование NOMb

Значение показателя a^* (краснота) в обработанной с помощью СО сырой свинине, говядине, курице и соленой свинине увеличивается, что указывает на факт формирования COMb, когда Mb и СО вместе присутствуют в продукте. Экстракты образцов мяса продемонстрировали спектры поглощения, специфические для COMb.

В опытном растворе COMb был термоустойчив и оставался стабильным в течение всего времени охлаждения (Рис. 6), при этом уровень pH поддерживался в диапазоне от 5,0 до 8,0. Значение pH в мясе обычно составляет около 5,5, поэтому красный цвет мяса должен сохраняться в присутствии СО.

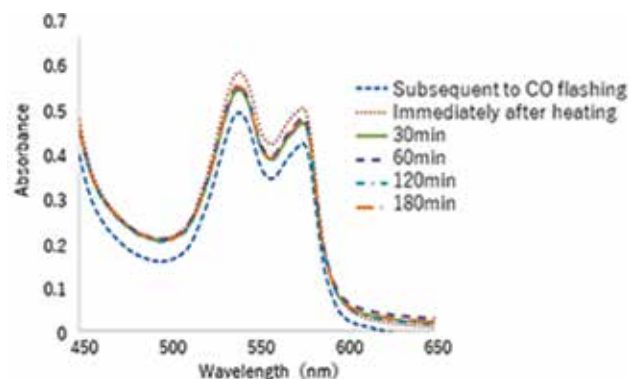


Рис. 6. Спектры поглощения раствора COMb после нагревания и охлаждения в течение 180 минут

COMb можно экстрагировать водой, но практически невозможно ацетоном (Рис. 7), в отличие от NOMb (данные не представлены). Таким образом, коэффициент формирования COMb относительно общего уровня Mb в настоящем исследовании не может быть определен.

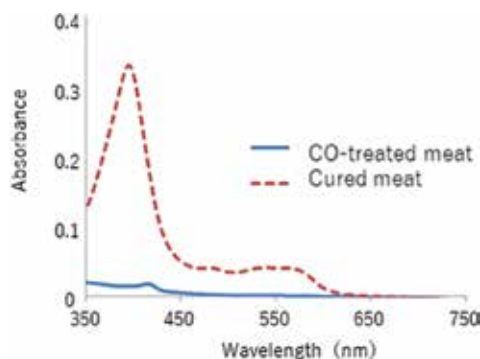


Рис. 7. Спектры поглощения обработанного с помощью СО и соленого мяса после экстракции

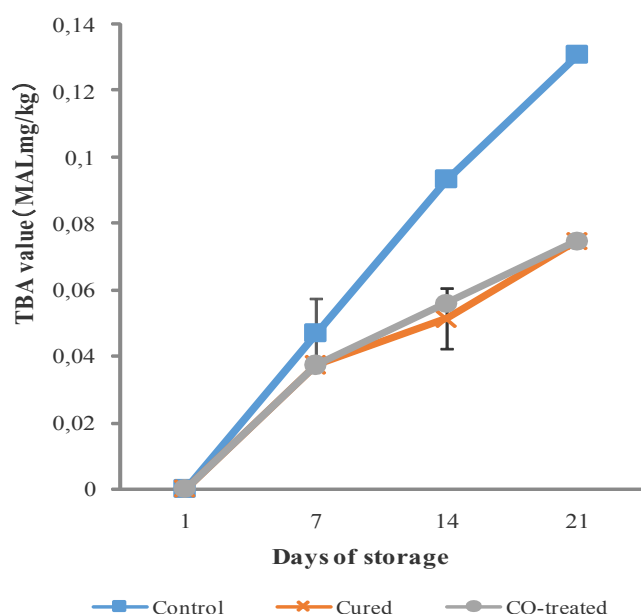


Рис. 8. Изменение значений ТВА в свинине во время хранения

По сравнению с контролем, значения ТВА для сырого мяса значительно увеличивались во время хранения с 7-го по 21-й день, но для свинины, обработанной с по-

мощью СО, они снижались почти до тех же величин, что наблюдались в группе NO (Рис. 8). Таким образом, было показано, что СО так же, как нитрит, эффективен в контроле окисления липидов в сырой свинине. СО ингибировал роста микроорганизмов, что также отмечено для нитрита (данные не представлены).

4. Заключение

Было обнаружено, что гималайская каменная соль эффективна в улучшении формирования красного цвета мяса при очень небольшом содержании нитрита в рецептуре или даже при его отсутствии. Значение CFR в вареных мясных продуктах изменялось в зависимости от содержания пигмента гема из-за низкой степени его нитрозирования в мясе. Нитрат может усиливать эффект гималайской каменной соли в отношении формирования цвета мяса. Тем не менее, в каменной соли должны содержаться и другие факторы формирования красного цвета, поскольку нитрат оказывает лишь небольшое влияние на формирование цвета.

Было отмечено, что COMb быстро образуется в мясе при совместном присутствии там Mb и СО, что приводит к формированию ярко-красного цвета. Из этого следует, что использование СО может способствовать значительному снижению количество нитрита, добавляемого в мясные продукты, при этом сохраняя формирование приемлемого красного цвета. Кроме того, СО может функционировать в мясе так же, как и нитрит. Сам по себе СО может быть ответственен за неожиданное формирование красного цвета мяса, которое отмечалось на предприятиях общественного питания, но подтверждение этого факта требует дополнительных исследований.

Благодарности

Авторы благодарят д-ра М. Motoyama (Национальная организация сельского хозяйства и пищевых продуктов (NARO), Япония), г-на Y Miki и г-жу М. Kaneko (являются выпускниками Университета Азабу, Япония) за помощь в проведении обработки с помощью СО.

1. Introduction

The purchase of meat products is initially based on color prior to any assessment of parameters such as odor, taste or texture. Meat color is the primary determinant of any decision to purchase a meat product. Color developing agents such as nitrite and nitrate have been found quite useful but food safety considerations limit the extent of their usage.

In recent years, attention has come to be increasingly directed to food safety in response to consumer demands in this regard. Accordingly, techniques for effectively enhancing the red color of meat products through the least possible use of nitrite and nitrate, but with usage of naturally occurring ingredients, have thus become modern day

focal points of emphasis [1, 2]. As substitutes for curing agents, natural animal substances are being avidly examined for potential application, both in Japan and foreign countries. The findings should prove valuable for enhancing and maintaining good food appearance as well as being in the best interests of human health.

However, unexpected reddening and discoloration problems have recently been pointed out and effective solutions must be found. The reddening effect of Himalayan rock salt on meat products was previously reported [3].

In uncured meat products, carboxy myoglobin (COMb) can be considered a major reason for unexpected meat reddening. Carbon monoxide (CO) binds strongly to myoglo-

bin (Mb) to form COMb, which shows a stable bright red color. The addition of CO to food is prohibited by law in Japan, though in foreign countries, this compound is applied as a gas in food packing, and its use in meat products is being carefully examined [4, 5]. Should CO be capable of lowering nitrite content in meat, its use should not meet with any consumer objections.

Natural salts, particularly those in Himalayan rock salts, should prove favorable candidates for reddening of meat products, since they contain nitrite along with nitrate in only small amounts, plus minerals. Yellow salt (YS) from Himalayan products was, therefore, examined in this study for its capacity to bring about a red coloration in meat products and the results were compared with those for ordinary cooking salts.

Nitrate is considered a precursor of nitrite in color formation through its reduction by a bacterium. Alley, Cours, and Demeyer [6] have shown that nitrate can stabilize color in uncooked meat products. Ockerman and Kuo [7], however, consider nitrate to lessen the decline of nitrite in cooked cured meats. Differences in the conclusions from these studies may be explained due to the presence or absence of sodium ascorbate. The present study was conducted to determine whether nitrate is reduced subsequent to heat application and whether nitrate has any effect on nitrite kinetics in cooked cured pork sausage during storage.

Additionally, the characteristics of CO, such as its strong binding to Mb, leading to an attractive red meat color, were also investigated in this study. A comparison was made of parameters such as heat stability, extractability and formation of COMb at different pHs. Mb derivatives were then investigated spectrophotometrically subsequent to CO flushing into nitrosylmyoglobin (NOMb). The antioxidative effects of CO on meat were also examined.

2. Materials and Methods

2.1. Natural salts experiment

Meat taken from pork leg was depleted as much as possible of its fat and connective tissue and then minced. YS or NaCl was added at 2% to each meat sample, along with 0.1% sodium ascorbate and NaNO_2 in the concentration range: 0, 10, 30, 50 or 100 ppm. After 4 days storage at 4°C under anaerobic conditions, the mince samples were cooked at 75 °C for 30 min. After sample cooling, color was assessed visually and then with a spectral colorimeter.

The color forming ratio (CFR) [8], and heme pigment content were measured by acetone extraction. Residual nitrite and nitrate content were determined according to the method of Mirna and Schütz [9] and by copper-cadmium column reduction, respectively.

2.2. Effect of nitrate on cooked cured pork

All chemicals used were of standard laboratory grade, obtained from Wako Pure Chemical Industries (Tokyo,

Japan) and used without further purification. The *Longissimus dorsi* (*L. dorsi*; pH 5.7) and *Biceps femoris* (*B. femoris*; pH 5.8) obtained from 5-month old female pigs (three-way cross pig: Landrace, Large White and Duroc) were used to prepare model products.

Model sausage and model ham were prepared from minced *B. femoris* and a whole cut of *L. dorsi*. Each sample cured for 7 days with nitrate was designated as either «+Nitrate» or without nitrate, as the control. Each 1,500 g sample was cured for 7 days with 300 mL brine containing: +Nitrate: NaCl 27 g, NaNO_2 0.248 g and KNO_3 0.728 g; the control containing NaCl 27 g and NaNO_2 0.248 g. Sample quantity in all cases exceeded 300 g and was vacuum packed into 5 bags. These samples were cooked in a water bath at 75 °C for 30 min and stored at 10 °C with fluorescent illumination (2,000 lx).

Color and concentration of nitrite and nitrate were monitored each week for 4 weeks. Residual nitrite was measured by the method of Sakata and Nagata [10]. Nitrite concentration in the extract was determined subsequent to the flow of the extract through a Cu-Cd column (flow rate: 5 mL/min), the difference in concentration of nitrite before and after flow through this column was considered to be the concentration of nitrate [11]. Surface color was assessed as L^* , a^* and b^* using a colorimeter (CM-2002, Konica Minolta, Japan).

This experiment was conducted *in vitro* using the reaction solutions prepared by mixing 2 mL of 2 M acetic acid buffer (pH 4.5), 1 mL of 0.1 M NaNO_2 and 1 mL of distilled water. The ratio of nitrite decrement to nitrate production was determined based on the absorption values using a spectrophotometer (UV-2700, Shimadzu, Japan). Nitrate concentration was computed based on its peak at 303 nm. Nitrite absorption spectra varied with pH owing to changes in nitrite and HNO_2 content, hence, the isosbestic point of 324 nm for nitrite and HNO_2 was used for determining nitrite concentrations. Each solution was maintained at 20 °C before use, and then absorption was measured at 324 nm/303 nm every 20 seconds more than 350 times at 20 °C following mixing of all solutions.

2.3. CO experiment

COMb was prepared in a model solution (0.1% Mb-0.2% Na_2SO_4 , pH 5.5 with CO gas flushing) and cooked at 70 °C for 20 min. The absorption spectra of COMb at pHs adjusted to 5.0–9.0 were monitored.

CO-treated meat and cured meat samples were prepared with pig thigh flushed with CO, to which 100 ppm NaNO_2 had been added, and the meats then kept at 2 °C for 4 days. a^* value was measured spectrophotometrically (CM-2002, Konica Minolta, Japan). COMb and NOMb were extracted with water or 75 % acetone and the absorption spectra of the solutions thus obtained were used to determine the extent of COMb formation. Lipid oxidation in each meat sample was also evaluated by 2-thiobarbituric acid (TBA) analysis [12].

Absorption spectra of NOMb solution (0.1% Mb-1% Na ascorbate-0.1% NaNO_2 , pH 5.5) previously flushed with CO was measured to determine the extent of COMb formation.

3. Results and Discussion

3.1. Effects of yellow rock salt and low levels of nitrite and nitrate on meat color

In mince with added NaCl and without nitrite, the CFR and a^* (redness) were less than those measured in YS mince samples. In YS mince samples with and without nitrite, meat redness and CFR were found to exceed 70 %, regardless of the low nitrite range, from 0 to 100 ppm (Fig. 1).

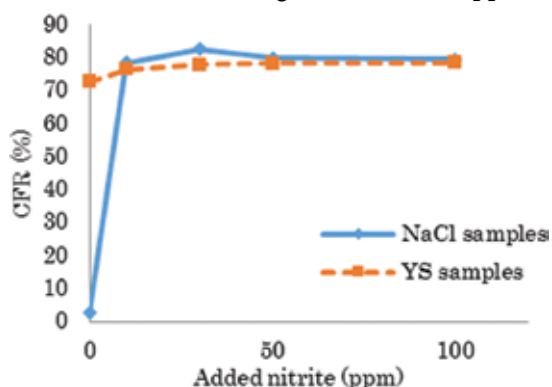


Figure 1. Color forming ratio (CFR)

Compared to NaCl mince samples, residual nitrite content was usually higher in mince with added YS (Fig. 2). The YS itself contained more nitrite than nitrate. YS was, thus, shown to effectively enhance meat reddening. Small amounts of nitrite, nitrate and minerals in the YS could possibly have contributed to this finding.

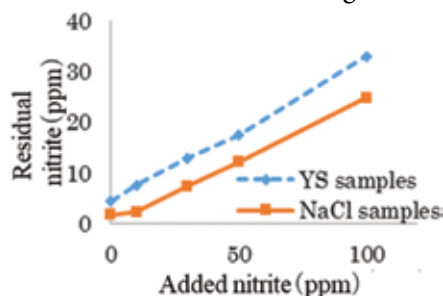


Figure 2. Residual nitrite levels

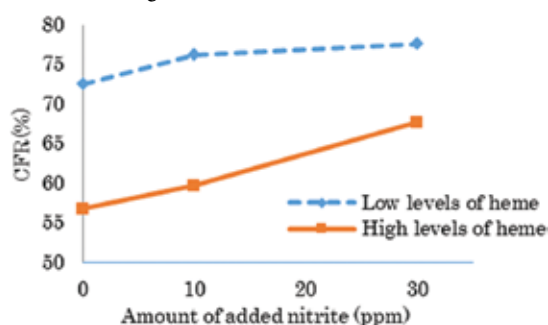


Figure3. Color forming ratio as a function of heme pigment content

The CFR was noted to change with increase in heme pigment content in pork mince with added YS. When the

content of heme was quite small, the CFR in the mince samples was larger than in mince with more heme (Fig. 3). This could possibly have been due to the limited capacity of heme nitrosation to bring about meat reddening.

3.2. Effect of nitrate on color stability of cooked pork

The instrumental color value, a^* (redness) declined rapidly in cooked pork ham cured with nitrite (Control) than the pork ham cured with nitrite and nitrate (+Nitrate) during storage period (Fig. 4).

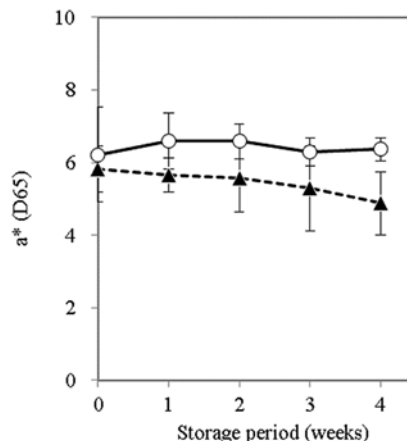


Figure 4. Effects of nitrate on color stability in model ham.

Control: cured with 1.5 % NaCl and 2 mM NaNO_2 ; indicated by the filled triangle symbol (▲).

+Nitrate: cured with 1.5 % NaCl, 2 mM NaNO_2 and 4 mM KNO_3 ; indicated by the open circle symbol (○).

The concentration of residual nitrite was maintained at 3–4 weeks by the addition of nitrate in the model ham system (Fig. 5). The results in this study suggest that nitrite decomposition progresses as a reversible reaction as shown above. Therefore, nitrate inhibits the decrease of residual nitrite in cooked cured pork. The accelerative effect of nitrate on the meat color formation was limited even if the nitrate was added in sufficient quantities. Thus, the nitrate in YS could enhance the color formation but there would be the other factors in YS.

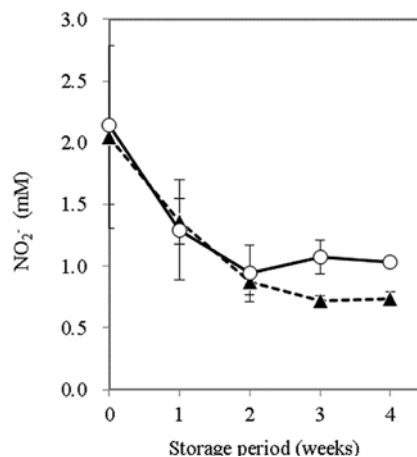


Figure 5. Effects of nitrate on the rate decrease in residual nitrite.

Control: cured with 1.5 % NaCl and 2 mM NaNO_2 ; indicated by the filled triangle symbol (▲).

+Nitrate: cured with 1.5 % NaCl, 2 mM NaNO_2 and 4 mM KNO_3 ; indicated by the open circle symbol (○).

3.3. Effects of CO gas on meat and NOMb

a^* values (redness) increased in CO-treated raw pork, beef, chicken and cured pork, indicating COMb to have formed when Mb and CO were present together. The meat sample extracts showed the specific absorption spectra of COMb.

In a model solution, COMb was heat stable and stable throughout the given cooling times (Fig. 6), with pH maintained within a range of 5.0 to ~8.0. Meat pH is normally approximately 5.5, so this indicates the red color of meat should be maintained in the presence of CO.

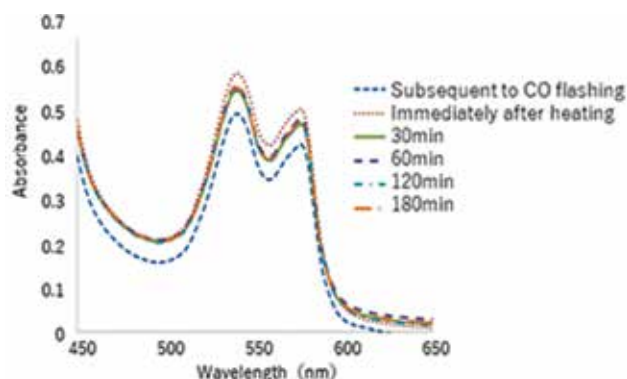


Figure 6. Absorption spectra of COMb solution after heating and cooling for up to 180 mins

The extraction of COMb was possible with water, though virtually impossible with acetone (Fig. 7), in contrast to NOMb (data not shown). Thus, the extent of COMb formation compared to total Mb could not be determined in the present study.

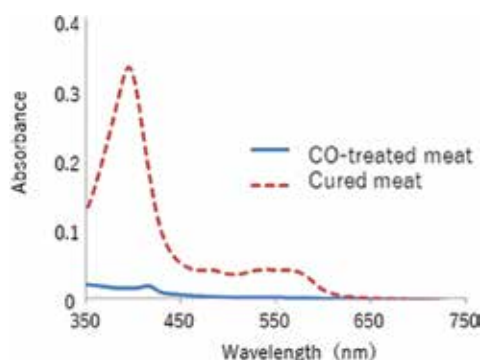


Figure 7. Absorption spectra of CO-treated and cured meat after extraction with

Even when CO was added to NOMb solution, the absorption spectrum of NOMb showed no change (data not shown), thus indicating the higher affinity of NO than CO toward Mb. The addition of NaNO_2 (100 ppm) to COMb resulted in a change in the absorption spectrum of the NOMb formed (data not shown).

TBA values of raw meat increased significantly during storage, but TBA values for CO-treated pork decreased to nearly the same as those observed in the NO-group,

compared to the control, from day 7 to day 21 of storage (Fig. 8). Therefore, CO was shown to be as capable as nitrite of controlling lipid oxidation in raw pork. CO proved inhibitory to microorganism growth, as was also noted for nitrite (data not shown).

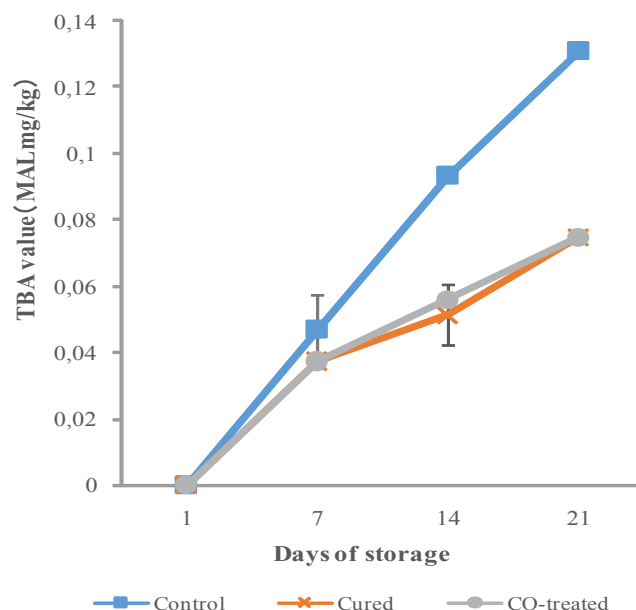


Figure 8. Change in pork TBA value during storage

4. Conclusion

Himalayan rock salt was found to be effective for enhancing the red color of meat at very small nitrite content or even in the absence of nitrite. The CFR in cooked meat changed with heme pigment content in meat, owing to the low degree of nitrosation in the meat. The nitrate could play a part in the accelerative effect of Himalayan rock salt on the meat color formation. However, there would be the other reddening factors in the rock salt because the nitrate made a little impact on the color formation.

COMb was noted to form rapidly in meat when Mb and CO were combined, giving rise to a bright red color in the meat. It follows then, that CO could serve to significantly lessen the amount of nitrite added to meat products, while still supporting formation of an acceptable red color. CO could also function in a very similar fashion as nitrite in meat. CO itself could possibly be a factor for the unexpected reddening of meat as noted at food service facilities, but confirmation of this point will require additional research.

Acknowledgements

The authors are thankful to Dr. M Motoyama (National Agriculture and Food Research Organization (NARO), Japan), Mr. Y Miki and Miss M Kaneko (the latter two are graduates of the Azabu University, Japan) for their assistance in conducting the CO treatment.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК / REFERENCES

1. Mancini, R.A., Hunt, M.C. (2005). Current research in meat color. *Meat Science*, 71(1), 100–121.
2. Sakata, R. (2010). Prospects for new technology of meat processing in Japan. *Meat Science*, 86 (1), 243–248.
3. Kaneko, M., Okuda, Y., Waga, M., Oshida, T., Sakata, R. (2014). Enhanced reddening of meat by the addition of himalayan rock salt. *Proceedings of the 60th International Congress of Meat Science and Technology, Punta del Uste, Uruguay*, CD068.
4. Suman, S.P., Hunt, M.C., Nair, M.N., Rentfrow, G. (2014). Improving beef color stability: Practical strategies and underlying mechanisms. *Meat Science*, 98 (3), 490–504.
5. Van Rooyen, L.A., Allen, P., O'Connor, D.I. (2017). The application of carbon monoxide in meat packaging needs to be re-evaluated within the EU: An overview. *Meat Science*, 132, 179–188.
6. Alley, G., Cours, D., Demeyer, D. (1992). Effect of nitrate, nitrite and ascorbate on colour and colour stability of dry, fermented sausage prepared using 'back slopping'. *Meat Science*, 32 (3), 279–287.
7. Ockerman, H.W., Kuo, J.C. (1982). Dried Pork as Influenced by Nitrate, Packaging Method and Storage. *Journal of Food Science*, 47 (5), 1631–1634.
8. Sakata, R., Ohso, M., Nagata, Y. (1981). Effect of Porcine Muscle Conditions on the Color of Cooked Cured Meat Products. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45 (9), 2077–2081.
9. Mirna, A. (1972). Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung des Pökelfarbstoffes sowie von Nitrit und Nitrat im Fleischzeignissen. *Fleischwirtschaft*. 52, 337–338.
10. Sakata, R., Nagata, Y. (1992). Heme pigment content in meat as affected by the addition of curing agents. *Meat Science*, 32 (3), 343–350.
11. Pérez-Rodríguez, M. L., Bosch-Bosch, N., García-Mata, M. (1996). Monitoring nitrite and nitrate residues in frankfurters during processing and storage. *Meat Science*, 44 (1–2), 65–73.
12. Yamauchi, K., Murata, H., Ohashi, T., Katayama, H., Pearson, A.L., Okada, T., Yamakura, T. (1991). Effect of dietary α -tocopherol supplementation on the molar ratio of polyunsaturated fatty acids/ α -tocopherol in broiler skeletal muscles and subcellular membranes and its relationship to oxidative stability. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 38, 545–552.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Принадлежность к организации

Саката Риоичи — профессор, Лаборатория науки о пище, Институт ветеринарной медицины, Университет Асабу
Sagamihara, Kanagawa 252–5201, Japan
Тел.: +81–42–754–71–11
E-mail: sakata@azabu-u.ac.jp

Такеда Широ — Адыюнк- профессор, Лаборатория науки о пище, Институт ветеринарной медицины, Университет Асабу
Sagamihara, Kanagawa 252–5201, Japan
Тел.: +81–42–754–71–11
E-mail: s-takeda@azabu-u.ac.jp
*автор для контактов

Вара Масахиро — Ph.D, помощник руководителя отдела технического управления, производственный дивизион, корпорация Itoham Foods, Meguro, Tokyo 153–8587, Japan
Тел.: +81–3–572–60–98
E-mail: masahiro.waga@outlook.com

Критерии авторства

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.10.2017

AUTHOR INFORMATION

Affiliation

Sakata Ryoichi — Professor, Laboratory of Food Science, School of Veterinary Medicine, Azabu University
Sagamihara, Kanagawa 252–5201, Japan
Tel.: +81–42–754–71–11
E-mail: sakata@azabu-u.ac.jp

Takeda Shiro — Associate Professor, Laboratory of Food Science School of Veterinary Medicine, Azabu University
Sagamihara, Kanagawa 252–5201, Japan
Tel.: +81–42–754–71–11
E-mail: s-takeda@azabu-u.ac.jp
*corresponding author

Waga Masahiro — Ph.D, Assistant Chief
Technical Management Sector, Production Division, Itoham Foods Inc., Tokyo Office,
Meguro, Tokyo 153–8587, Japan
Tel.: +81–3–572–60–98
E-mail: masahiro.waga@outlook.com

Contribution

The authors equally contributed to the writing of the manuscript and are equally responsible for plagiarism.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Received 11.10.2017

ДИСБИОЗ КИШЕЧНИКА, ЗДОРОВЬЕ ЧЕЛОВЕКА И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ПИТАНИЕ

Чичерин И.Ю.¹, Погорельский И.П.², Лундовских И.А.², Дармов И.В.², Шабалина М.Р.²

¹ Научное общество «Микробиота», Сергиев Посад, Московская область, Россия

² Вятский государственный университет, Киров, Россия

Ключевые слова: дисбиоз, микробиоценоз, пробиотик, приживаемость в кишечнике, лабораторные животные, добровольцы.

Аннотация

Интерес научных работников, терапевтов, педиатров, врачей общего профиля к проблеме дисбиоза кишечника обусловлен тем, что существуют самые тесные связи между нарушением микробиоценоза кишечника и органической, а также функциональной патологией не только желудочно-кишечного тракта, но и других органов. На протяжении свыше 50 лет пробиотики являлись ведущим средством коррекции дисбиотических нарушений микробиоценоза кишечника. Однако ответ кишечной микробиоты на экзогенное поступление в организм пробиотиков вариателен или вовсе отсутствует. В настоящей статье представлены анализ литературных данных и результаты собственных экспериментальных исследований на добровольцах, полностью подтверждающие полученные ранее данные на лабораторных животных, согласно которым, пробиотические микроорганизмы являются чужеродными и не приживаются в желудочно-кишечном тракте людей и животных, а их взаимодействие с организмом носит характер «хозяин против пробиотика». Приведены результаты сравнительного изучения в опытах на животных эффективности 18 современных средств коррекции нарушений микробиоценоза кишечника при антибиотико-ассоциированном дисбиозе кишечника. Проведено сравнительное экспериментальное изучение эффективности восстановления кишечной микробиоты современных, часто применяемых в клинической практике препаратов, а также инновационных коммерческих и экспериментальных препаратов последнего времени (Актофлор-С, Стимбифид плюс, Стимекс) при антибиотико-ассоциированном дисбиозе у конвенциональных белых мышей.

Lecture for specialists

INTESTINAL DYSBIOSIS, HUMAN HEALTH AND FUNCTIONAL NUTRITION

Igor Yu. Chicherin¹, Ivan P. Pogorelsky², Irina A. Lundovskikh², Ilya V. Darmov², Marina R. Shabalina²

¹ Scientific society «Microbiota», Sergiev Posad, Moscow Region, Russia

² Vyatka State University, Kirov, Russia

Key words: dysbiosis, microbiocenosis, probiotics, survival in the intestine, laboratory animals, volunteers.

Abstract:

The interest of scientists, physicians, pediatricians, general practitioners to the problem of intestinal dysbiosis is caused by the fact that there are very close relations between the intestinal microbiocenosis disorders and organic and functional pathology not only of the gastrointestinal tract, but also of other organs. For more than 50 years probiotics have been the leading tool for correction of intestinal microbiocenosis. However, the response of intestinal microbiota to exogenous intake of probiotics is variable, or is completely absent. The article presents the analysis of the literature data and results of our own experimental studies on human volunteers, fully confirming previous findings on laboratory animals, according to which the probiotic microorganisms are foreign and do not survive in the gastrointestinal tract of humans and animals, and their interaction with the host organism has the character of «host against probiotic». The results of the comparative study on the effectiveness of 18 modern preparations for correction of intestinal microbiocenosis at antibiotic-associated dysbiosis in experiments on animals are given. The comparative experimental research on the effectiveness of modern preparations that are frequently used in clinical practice as well as recent innovative commercial and experimental preparations (Actoflor-C, Stimbid plus, Stimex) regarding intestinal microbiota recovery at antibiotic-associated dysbiosis in conventional white mice was carried out.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Чичерин И.Ю., Погорельский И.П., Лундовских И.А., Дармов И.В., Шабалина М.Р. Дисбиоз кишечника, здоровье человека и функциональное питание. Теория и практика переработки мяса. 2017; 2(4):44-61. DOI:10.21323/2414-438X-2017-2-4-44-61

FOR CITATION: Chicherin I.Yu., Pogorelsky I.P., Lundovskikh I.A., Darmov I.V., Shabalina M.R. Intestinal dysbiosis, human health and functional nutrition. Theory and practice of meat processing. 2017;2(4):44-61. (In Russ.) DOI:10.21323/2414-438X-2017-2-4-44-61

Микробиота кишечника как самостоятельный орган, именуемый в научной литературе «парацитарной системой» [1], играет существенную роль в жизнедеятельности организма хозяина: в обмене веществ, детоксикации, формировании естественного иммунитета, создании колонизационной резистентности, противостоящей патогенным и условно-патогенным микроорганизмам на начальном этапе развития инфекционного процесса [2, 3, 4]. Знания о роли микробиоты кишечника постоянно расширяются и обновляются как в направлении получения новых данных о ее функциях, так и о свойствах, что дало основание считать микробиоту кишечника главным биогенным фактором, определяющим здоровье или развитие заболевания [5]. Разбалансировка указанной системы вследствие приема антибактериальных препаратов, изменения среды обитания и характера питания, гастроэнтерологических заболеваний, а также воздействия других факторов, приводит к развитию клинко-лабораторного синдрома — дисбиозу [6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14].

Арсенал средств профилактики и лечения дисбиотических нарушений микробиоценоза кишечника довольно широк, и особое место на протяжении более 50 лет отводится пробиотикам — препаратам, содержащим живые микроорганизмы, которые являются представителями нормальной микробиоты толстой кишки [6, 7]. Примечательно, что только через десятилетия, в течение которых осуществлялось применение пробиотиков в России, в Резолюции Экспертного Совета по вопросам эффективности, безопасности и регуляторным аспектам применения пробиотиков в РФ и других странах от 7.11.2015 г. [15], со ссылками на научные публикации констатируется, хотя и с оговорками, возможность возникновения системных инфекций (эндокардита, сепсиса, менингита, бактериемии, пневмонии), вызванных лактобациллами, при применении пробиотиков.

Согласно Besselink, M.G.H. и соавторов [16], в Нидерландах в 2004–2007 гг. в 15 клиниках Утрехтского университета в мультицентровом, рандомизированном, двойном-слепом, плацебо-контролируемом исследовании было изучено влияние мультиштаммового пробиотика на снижение инфекционных осложнений у 296 пациентов с панкреатитом. В ходе лечения в группе с использованием пробиотика 24 пациента скончались. В контрольной группе пациентов, не получавших пробиотик, смертность была 2,5 раза ниже. Причины случившегося пока неизвестны, однако в октябре 2015 г. по настоянию голландских ученых было досрочно прекращено аналогичное исследование, проводившееся на территории Чешской республики.

Группой российских ученых были проведены экспериментальные исследования с целью выяснения возможной причины смертельных случаев у пациентов университетских клиник, свидетельствующих

о биологически опасном потенциале пробиотических препаратов. В ходе исследований с использованием лабораторных животных было установлено, что потенциальная опасность пробиотиков состоит в способности чужеродных микроорганизмов, входящих в их состав, инициировать за счет повышенной антигенной и аллергенной нагрузки на макроорганизм транслокацию (перенос в несвойственный биотоп) кишечной микробиоты в кровотоки и брюшную полость, вследствие чего отмечалась гибель более 30 % экспериментальных животных от инфекционно-токсического (эндотоксического) шока с развитием бактериемии и перитонита [17, 18].

Таким образом, практика клинических и экспериментальных исследований со всей очевидностью обнажила проблему эффективности и безопасности пробиотиков. Но если эксперты только в 2015 г. констатировали факт потенциальной опасности пробиотиков [15], то опубликованные в 2005–2006 гг. результаты экспериментальных исследований [19, 20] приблизили ученых к пониманию того, что одной лишь констатации наличия либо отсутствия эффективности пробиотикотерапии, или её транзитного характера совершенно недостаточно.

Оказалось, что в нарушение стандартов, которым должны соответствовать пробиотики [7], их эффективность в опытах на животных, как этого требует Комиссия ООН по этике, экспериментально зачастую не была доказана (Рис. 1). Стандартам должны соответствовать в первую очередь микроорганизмы в составе препаратов, которые, в частности, должны быть защищены от воздействия пищеварительных ферментов и желчи; их эффективность и безопасность для людей должны быть доказаны экспериментально; генетическая стабильность свойств микроорганизмов должна быть гарантированной; качественная лиофилизация микроорганизмов должна обеспечивать высокую выживаемость при пероральном приеме пробиотика.



Рис. 1. Традиционно сложившаяся последовательность действий при разработке пробиотических препаратов

В действительности непосредственно после теоретического обоснования включения того или иного микроорганизма в качестве перспективного для создания на его основе пробиотического препарата вся

деятельность разработчиков переключалась на биотехнологию нового препарата и его продвижение на рынок пробиотиков.

Второй очень важный этап доклинического экспериментального обоснования безопасности, безвредности и эффективности как микроорганизмов, так и дополнительных ингредиентов, включаемых в состав пробиотических препаратов, по негласному умолчанию выводился из логической цепочки действий при разработке и клиническом испытании самих препаратов. Это повлекло за собой в последующем при клинических испытаниях возникновение проблем, связанных не только с ростом дисбиозов у населения, несмотря на значительный арсенал пробиотических препаратов, но и с их безопасностью.

В течение длительного периода времени не существовало метода определения биодоступности пробиотических микроорганизмов (выживаемости при транзите по желудочно-кишечному тракту); не был установлен механизм действия пробиотических микроорганизмов (заместительное действие, т.е. приживаемость в биопленке слизистой оболочки кишечника); не была доказана безопасность применения пробиотических препаратов (биосовместимость микроорганизмов в составе пробиотиков с индигенной микробиотой, вероятность ее транслокации за пределы стенки кишечника и т.д.).

Данная проблема была успешно решена группой российских ученых, разработавших, во-первых, универсальный метод дифференциации пробиотических и индигенных микроорганизмов путем получения маркированных производных пробиотических бактерий, выделенных из кишечного содержимого лабораторных животных, стабильно наследующих признак устойчивости к антибиотику рифампицину и сохраняющих видовые характеристики [14, 17, 18, 21, 22, 23, 24, 25].

Во-вторых, был разработан экспресс-метод, обеспечивающий в эксперименте на подопытных животных инициацию дисбиоза кишечника [24, 25, 26, 27, 28].

В-третьих, в 2012 г. впервые был введен в научный оборот универсальный показатель, характеризующий количественные изменения микробиоты кишечника у животных в эксперименте под действием средств коррекции микробиоценоза, а именно «скорость восстановления микробиоты кишечника» [27, 28]. Универсальность показателя состоит в том, что с его помощью можно оценивать воздействие как положительных (скорость восстановления), так и негативных (скорость угнетения) факторов на общее содержание микроорганизмов и отдельных представителей кишечной микробиоты. Данный интегративный показатель, учитывающий весь комплекс воздействующих на кишечную микробиоту факторов, позволяет получать количественную характеристику процесса восстановления (угнетения) кишечной микробиоты

(КОЕ·г⁻¹·сут⁻¹) в сравнении с аналогичным показателем, который определяется в контрольном эксперименте на животных при самовосстановлении их кишечного микробиоценоза (кратность к контролю).

Результаты экспериментов по изучению выживаемости бифидобактерий и лактобацилл в условиях *in vitro* в желудочном соке и дуоденальном содержимом людей [29] и было установлено, что за время инкубирования бифидобактерий и лактобацилл в указанных биологических средах, происходит значительное сокращение количества жизнеспособных пробиотических микроорганизмов в сравнении с исходным их количеством, вплоть до единичных клеток в случае бифидобактерий.

Установлено существенное (на 4–7 порядков) снижение численности поступающих в организм подопытных животных пробиотических микроорганизмов [21]. Эти данные подтверждают результаты предыдущих исследований *in vitro* [30, 31] о крайне низкой выживаемости пробиотических микроорганизмов в агрессивных средах.

В контексте изложенного, следует отметить результаты экспериментов, которые были опубликованные в работе [32]. Согласно представленным данным, удаление пробиотических микроорганизмов из коммерческого биокомплекса «Нормофлорин-Б1» повышает эффективность препарата по восстановлению нормобиоты у животных с антибиотико-ассоциированным дисбиозом почти в 60 раз, а сами живые бактерии, удаленные из биокомплекса, при энтеральном введении животным с антибиотико-ассоциированным дисбиозом не обладают способностью стимулировать восстановление кишечной микробиоты. Таким образом, экспериментально было доказано, что не пробиотические микроорганизмы, а их метаболиты вносят существенный вклад в нормализацию нарушений микробиоценоза кишечника [32, 33].

Можно констатировать, что в ходе пассажа через пищеварительный тракт подопытных животных происходит снижение численности пробиотических микроорганизмов ниже критической, после чего невозможна выживаемость популяции в целом. Эти данные, подкрепленные результатами исследований видовой, тканевой и индивидуальной специфичности, а также гетерологичности пробиотических бактерий для организма нового хозяина [18], их несовместимости с его резидентной микробиотой, свидетельствуют об экологической и функциональной маргинальности пробиотических микроорганизмов [34] и невозможности с их помощью изменить уже сформировавшуюся еще при рождении собственную микробиоту как у здоровых людей [35], так и у лиц с дисбиотическими изменениями кишечной микробиоты [33, 36].

В научных дискуссиях на протяжении последних летне были опровергнуты опубликованные результаты экспериментальных исследований на лаборатор-

ных животных, в которых на фактическом материале доказывалась необходимость ради здоровья пациентов изменить взгляд на проблему пробиотиков и пробиотикотерапии. Оппоненты, выражая свои сомнения, указывают на то, что нельзя экстраполировать данные, полученные на лабораторных животных, на организм людей. Особый скепсис выражали педиатры, утверждавшие, что у детей все иначе (дети не мыши!), постоянно подчеркивая необходимость проведения исследований с участием добровольцев для полноты ясности в разрешении этой сложной проблемы.

Действительно, данная проблема потребовала на первом этапе исследований решения ряда вопросов теоретического, методологического и организационного плана, в частности получения спонтанных рифампициноустойчивых (Rif^r) мутантов пробиотических лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3 со стабильно наследуемыми видовыми характеристиками и признаком антибиотико-резистентности (R-признаком), их выращивания на специальных питательных средах; адаптации методики инициации экспериментального антибиотико-ассоциированного дисбиоза, разработанной для лабораторных животных, к людям-добровольцам; выявления с использованием селективных плотных питательных сред в фекалиях лабораторных животных и добровольцев представителей кишечной микробиоты и маркированных по R-признаку лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3, определения их численности в 1 г фекалий; оценки в сравнительном плане эффективности современных средств коррекции кишечной микробиоты при экспериментальном антибиотико-ассоциированном дисбиозе как у лабораторных животных, так и у добровольцев.

Предваряя рассмотрение и оценку результатов собственных экспериментальных исследований, необходимо отметить, что разработчики и производители, посвятившие себя на протяжении десятилетий делу пробиотикотерапии, считали, что все микроорганизмы, которые были выделены от здоровых людей, являются «хорошими и полезными», а потому — перспективными для применения в биотехнологии пробиотиков.

Априорно у них, а также у врачей и больных сложилось представление о пробиотиках как о препаратах, обладающих лечебно-профилактической активностью, и что эти препараты без экспериментальной проверки на животных эффективности и безопасности можно включать в схемы лечения большинства заболеваний.

Как оказалось, такое представление далеко от действительности, поскольку именно вопросам эффективности и безопасности пробиотических микроорганизмов и регуляторным аспектам их применения в клинической практике было посвящено специальное заседание Экспертного Совета в ноябре 2015 г. в г. Москве [15]. В резолюции по итогам заседания экс-

перты констатировали, что пробиотики — это живые микроорганизмы, которые при назначении в адекватных количествах оказывают благотворное влияние на здоровье человека.

Резолюция Экспертного Совета [15] и обращение экспертов к профессиональному медицинскому сообществу с предложением обсудить основные проблемные вопросы, которые появились в последние годы, свидетельствуют о том, что данные вопросы накапливались гораздо быстрее, чем происходило их решение.

В свете результатов экспериментальных исследований, свидетельствующих о причастности пробиотических микроорганизмов к инициации транслокации кишечной микробиоты [17, 18], по-иному воспринимается предостережение М.Д. Ардатской и О.Н. Минушкина [37], высказанное еще в 2006 г.

Авторы убеждены, что нельзя не учитывать потенциальную опасность кишечной микробиоты и ее метаболитов, когда происходит транслокация микроорганизмов в нерезидентные биотопы и стерильные полости. Так, по данным цитируемых авторов, проникновение кишечной микробиоты в брюшную полость приводит к ее инфицированию и развитию спонтанного перитонита. Причем смертность больных с циррозом печени классов В и С по Чайльд-Пью (Child-Pugh) в этом случае достигает 50 %, а у 69 % больных наблюдается рецидив в течение года.

В серии публикаций [14, 21, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 34], содержащих результаты собственных экспериментальных исследований, группа российских ученых также фактически обращается к профессиональному медицинскому сообществу с предложением по-иному взглянуть на проблему пробиотиков и пробиотикотерапии.

В последние годы была переосмыслена стратегия по поддержанию кишечной микробиоты: получены убедительные доказательства того, что использование традиционных препаратов (пробиотиков) на основе живых микробов является не самым эффективным и безопасным путем коррекции микробиологических нарушений в кишечнике.

Экспериментально установлена низкая выживаемость лиофилизированных микроорганизмов (в капсулах или во флаконах) в составе пробиотических препаратов: при высеве суспензий регидратированных лиофилизированных пробиотических препаратов (в пределах срока годности) на специальные плотные питательные среды выживаемость микроорганизмов составляет 15–25 % от заявленного в инструкциях по применению количества «живых бактерий». Из оставшегося количества до толстой кишки доходит лишь мизерная часть пробиотических микроорганизмов, что и приводит, в том числе, к их низкой выживаемости в ходе транзита в кишечнике — ниже одной десятичной доли процента от исходного количества, поступившего в желудок в составе препарата. Было

также доказано, что в кишечнике даже при дисбиозе продолжают существовать свои жизнеспособные индигенные штаммы (аутоштаммы), а пробиотик, созданный на основе любого биотехнологического «универсального» штамма, является гетерологичным (чужеродным) и вступает в антагонистические отношения с аутоштаммами.

Следует учитывать также и то, что поступающие энтерально пробиотические микроорганизмы обладают лимфоцитотоксическим действием [38, 39], влияющим на способность иммунной системы пациента определить, какие микроорганизмы (свои или чужие) поступают в желудочно-кишечный тракт. Наличие у пробиотических микроорганизмов нежелательных для живого организма свойств еще раз свидетельствует о необходимости индивидуального подхода к выбору пробиотика, правильного подбора курсовых и разовых доз препарата.

На первом этапе собственных исследований, выполненных на животных и добровольцах (8 человек, один из которых являлся плацебо-контролируемым) без признаков нарушения микробиоценоза кишечника, был выявлен транзитный характер пребывания меченных (рифампициноустойчивых — Rif^r) лактобацилл в желудочно-кишечном тракте животных и людей и низкий уровень бактериовыделения с фекалиями (Табл. 1).

Одновременно была выявлена важная закономерность: в организме морских свинок выживаемость лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3(Rif^r) была ниже, чем в организме белых мышей, а в желудочно-кишечном тракте добровольцев ниже чем в организме белых мышей и морских свинок.

Причиной различия в выживаемости лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3(Rif^r) в желудочно-кишечном тракте белых мышей, морских свинок и добровольцев является, на наш взгляд, длина кишечника: по мере увеличения длины кишечника (белая мышка — морская свинка — человек), а также времени транзита бактерий по желудочно-кишечному тракту уменьшается численность лактобацилл в сравнении с 0,0000034 % (в кишечнике белых мышей) до 0,00000016 % (в кишечнике морских свинок) и до 0,000000008 % у людей. Важно отметить и другое: активная фаза выделения лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3(Rif^r) из организма добровольцев продолжалась до 5 суток, в то время как у белых мышей и морских свинок до 15 суток.

На втором этапе исследования были выполнены на животных и добровольцах с индуцированным пероральным введением гентамицина антибиотико-ассоциированным дисбиозом кишечника. Суточная доза антибиотика гентамицина при пероральном применении для животных рассчитывалась, исходя из суточной дозы для человека с учетом переводного коэффициента.

В ходе исследований изучался процесс восстановления индигенных лактобацилл под влиянием перорального введения маркированных пробиотических лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3(Rif^r) и возможность приживания последних в кишечнике в процессе их транзита. Исходя из данных количественного определения бактериологическим методом общего содержания микроорганизмов и отдельных представителей кишечной микробиоты в кишечнике животных и добровольцев, можно говорить о становлении у них третьей степени дисбиоза кишечника по И.К. Максиму [40] или третьей декомпенсированной неосложненной степени дисбиоза по О.Н. Минушкину с соавторами [7].

Бактериологическое изучение фекалий животных и добровольцев в ходе экспериментов дает основание полагать, что у животных идут два процесса: с одной стороны, медленное нарастание численности индигенных лактобацилл (скорость восстановления кишечной микробиоты на 12 сутки эксперимента составила $1,3 \cdot 10^4$ КОЕ·г⁻¹·сут⁻¹ для белых мышей и $7,2 \cdot 10^4$ КОЕ·г⁻¹·сут⁻¹ для морских свинок), а с другой, — увеличение численности пробиотических лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3 (Rif^r) в кишечном содержимом в первые двое суток их перорального поступления в организм, но довольно быстрое снижение после прекращения перорального их введения и полное исчезновение к 13–14 суткам наблюдения.

У всех 7 добровольцев с 4 по 8 сутки (с запозданием на 2 суток по сравнению с животными) были выявлены лактобациллы *L. plantarum* 8P-A3 (Rif^r) в количестве нескольких десятков в 1 г фекалий. С 9 суток, сразу после прекращения приема лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3(Rif^r) перос, они перестали высеваться из фекалий у трех добровольцев и в последующем численность пробиотических лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3(Rif^r) в фекалиях всех добровольцев стремительно снижалась; к 12 суткам (4 сутки после прекращения приема) выделение маркированных лактобацилл полностью прекратилось.

Таблица 1. Выживаемость лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3(Rif^r) при транзите через желудочно-кишечный тракт здоровых белых мышей, морских свинок и людей

Белые мыши			Морские свинки			Добровольцы		
Суточная доза, КОЕ	Содержание в фекалиях, КОЕ·г ⁻¹ ($\bar{x}$ на 2–10 сут.,	Выживаемость микробов, % (доля)	Суточная доза, КОЕ	Содержание в фекалиях, КОЕ·г ⁻¹ ($\bar{x}$ на 2–10 сут.,	Выживаемость микробов, % (доля)	Суточная доза, КОЕ	Содержание в фекалиях, КОЕ·г ⁻¹ ($\bar{x}$ на 2–10 сут.,	Выживаемость микробов, % (доля)
$5,2 \cdot 10^7$	175,1	0,0000034 ($3,4 \cdot 10^{-6}$)	$5,3 \cdot 10^8$	83,1	0,00000016 ($1,6 \cdot 10^{-7}$)	$2,0 \cdot 10^{10}$	159,2	0,000000008 ($8,0 \cdot 10^{-9}$)

Среднее значение показателей скорости восстановления индигенных лактобацилл у добровольцев опытной группы, равное $1,2 \cdot 10^5$ КОЕ·г⁻¹·сут⁻¹, практически не отличается от скорости самовосстановления индигенных лактобацилл у добровольца (биоконтроль) — $3,8 \cdot 10^5$ КОЕ·г⁻¹·сут⁻¹ при плацебо — контролируемом исследовании, что свидетельствует об отсутствии пробиотического эффекта от перорального введения пробиотических лактобацилл.

Приведенные результаты дают основание полагать, что пробиотические лактобациллы *L. plantarum* 8P-A3(Rif^r), находясь в пищеварительном тракте людей, не проявляют своих потенциальных способностей стимулировать восстановление, по крайней мере, индигенных лактобацилл. Очевидно, что в организме добровольцев, как и в организме белых мышей и морских свинок, пробиотические лактобациллы остаются чужеродными, не приживаются в кишечнике и не

Таблица 2. Характеристика исследованных современных препаратов

№ п/п	Название препарата	Вид препарата	Состав	Срок годности, %
1	Актофлор-С, серия 020316	Метабиотик нового поколения	Комплекс аминокислот и органических кислот — аналогов метаболитов пробиотических микроорганизмов	94
2	Аципол, серия 010116	Пробиотик	Живые ацидофильные бактерии, не менее $1 \cdot 10^7$ КОЕ в одной капсуле	87
3	Бак-Сет форте, лот 1091105	Мульти-пробиотик	<i>L. casei</i> PXN37, <i>L. plantarum</i> PXN47, <i>L. rhamnosus</i> PXN54, <i>B. bifidum</i> PXN23, <i>B. breve</i> PXN25, <i>B. longum</i> PXN25, <i>L. acidophilus</i> PXN35, <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> PXN63, <i>Streptococcus thermophilus</i> PXN66, <i>B. infantis</i> PXN27, <i>L. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> PXN39, <i>L. helveticus</i> PXN45, <i>L. salivarius</i> PXN57, <i>L. fermentum</i> PXN44, не менее $2 \cdot 10^9$ КОЕ в одной капсуле	79
4	Бактистатин, партия 090915	Метабиотик	Биологически активные метаболиты бесклеточной культуральной жидкости <i>B. subtilis</i> 3, витамин Е и гидролизат соевой муки	87
5	Бифиформ, серия 283236	Пробиотик	В одной капсуле <i>Enterococcus faecium</i> $1 \cdot 10^7$ КОЕ, <i>Bifidobacterium longum</i> $1 \cdot 10^7$ КОЕ	66
6	Биовестин лакто, свидетельство о госрегистрации № RU.77.99.11.003.Е. 044981. 10.11 от 31.10.2011 г.	Пробиотик	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл, <i>Lactobacillus plantarum</i> $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл и их продукты метаболизма	70
7	Лактофилтрум, серия 2101015	Пребиотик	Безмикробный препарат, содержит лигнин гидролизный, лактозу, целлюлозу микрокристаллическую	86
8	Линекс форте, серия FR4472	Пробиотик	Водной капсуле <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA 5 13,8 мг, <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> BB12 4,2 мг	75
9	Максилак, серия 8546308	Мульти-пробиотик + пребиотик	Одна капсула содержит лиофилизат пробиотических бактерий $4,5 \cdot 10^9$ КОЕ и пребиотический компонент олигофруктозу 63 мг. Леофилизат бактерий: <i>L. helveticus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. breve</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>B. bifidum</i>	83
10	Нормофлорин-Л, серия 0218	Синбиотик	В 1 мл культуры лактобактерий <i>L. acidophilus</i> не менее $1 \cdot 10^9$ КОЕ, продукты метаболизма бактерий	70
11	Примадофилус, серия 20050416	Пробиотик	В одной капсуле $2,9 \cdot 10^9$ КОЕ леофилизированных бактерий <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i>	79
12	Рио Флора, серия EF 0497	Мульти-пробиотик + пребиотик	В одной капсуле не менее $5 \cdot 10^8$ КОЕ/г пробиотических микроорганизмов: <i>B. bifidum</i> W 23, <i>B. lactis</i> W 51, <i>L. acidophilus</i> W37, <i>L. paracasei</i> W20, <i>L. plantarum</i> W62, <i>L. rhamnosus</i> W71, <i>L. salivarius</i> W24 с включением пребиотических компонентов — инулина, фруктоолигосахаридов	63
13	Стимбифид, серия 010316	Пребиотик	Олигофруктоза, инулин, премикс витаминно-минеральный «Immunity», микроэлементы — цинк и селен	94
14	Стимбифид плюс, серия 010616	Метапребиотик (метабиотик + пребиотик)	Фруктоолиго- и фруктополисахариды, кальций молочнокислый. Патент РФ	98
15	Стимекс, экспериментальная серия	Метапребиотик (метабиотик + пребиотик)	Инновационный экспериментальный комплекс, содержащий метабиотический и пребиотический компоненты. Патент РФ	97
16	Хилак форте, серия R21664	Метабиотик	Беззакисный водный субстрат продуктов обмена веществ <i>E. coli</i> DSM 4087, <i>S. faecalis</i> DSM 4086, <i>L. acidophilus</i> DSM 4149, <i>L. helveticus</i> DSM 4183	81
17	Флоролакт, серия 710615	Пребиотик	Гуммиарабик, фруктоолигосахариды, лактит (лактинол)	62
18	Энтерол, серия 1615	Пробиотик	В одной капсуле 250 мг леофилизированных сахаромикетов <i>Saccharomyces boulardii</i>	86

размножаются, не продуцируют естественные для них метаболиты и не оказывают стимулирующего влияния на индигенную микробиоту.

В условиях антибиотико-ассоциированного дисбиоза максимальная численность лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3(Rif^r) в фекалиях всех 7 добровольцев отмечалась на 4–8 сутки с начала приема арегос; однако уже через 1 сутки после последнего приема лактобацилл, на фоне возрастания численности собственной кишечной микробиоты и естественного усиления антагонизма с ее стороны, они перестали обнаруживаться в фекалиях 3 из 7 добровольцев, а на 4 сутки после завершения приема, как и в случае эксперимента при нормобиозе кишечника, лактобациллы *L. plantarum* 8P-A3(Rif^r) перестали обнаруживаться бактериологическим методом в фекалиях всех добровольцев.

Результаты исследований показали:

- микробиота кишечника эффективно противодействует заселению кишечника чужеродными микроорганизмами.
- идентичность поведения пробиотических микроорганизмов как в организме экспериментальных животных, так и людей,

Также нами проведено сравнительное экспериментальное изучение эффективности восстановления кишечной микробиоты современных, часто применяемых в клинической практике препаратов, а также инновационных коммерческих и экспериментальных препаратов последнего времени (Актофлор-С, Стимбифид плюс, Стимекс) при антибиотико-ассоциированном дисбиозе у конвенциональных белых мышей. Характеристика препаратов приведена в Табл. 2.

Эффективность перорального введения пробиотиков оценивали по скорости восстановления кишечной микробиоты у животных опытных групп в сравнении со скоростью самовосстановления микробиоты: $1,8 \cdot 10^5 \text{ КОЕ} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ по общему количеству микроорганизмов; $2,9 \cdot 10^3 \text{ КОЕ} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ по лактобациллам; $1,0 \cdot 10^4 \text{ КОЕ} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ по бифидобактериям; $3,3 \cdot 10^3 \text{ КОЕ} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ по эшерихиям у животных контрольной группы, которым не вводили регос препараты (скорость самовосстановления общего количества микробиоты и ее отдельных представителей принята за единицу). Обобщающие данные по сравнительной оценке эффективности современных средств коррекции нарушений микробиоценоза кишечника у конвенциональных белых мышей с антибиотико-ассоциированным дисбиозом приведены на Рис. 2.

Как следует из Рис. 2, имеются существенные отличия в эффективности восстановления кишечной микробиоты конвенциональных белых мышей с антибиотико-ассоциированным дисбиозом у изученных современных средств коррекции нарушений кишечной микробиоты: из 18 препаратов только 3 (Стимбифид, Стимбифид плюс и Стимекс) значительно превосходят по скорости восстановления кишечной

микробиоты аналогичный показатель контрольной группы животных (самовосстановление кишечной микробиоты).

Одиннадцать препаратов по скорости восстановления кишечной микробиоты оказались на уровне ее самовосстановления или незначительно его превышают, а три препарата избирательно стимулируют рост лактобацилл.

Таким образом, научно обоснована и экспериментально доказана необходимость наиболее эффективного и безопасного восстановления собственной (индигенной) микробиоты кишечника путём использования пребиотиков и метабиотиков, а также их композиций — метапребиотиков.

Всеобъемлющие сведения о препаратах, предназначенных для коррекции нарушений микробиоценоза кишечника, крайне важны для лечащего врача. И также, как в случае назначения антимикробных препаратов, когда лечащий врач в конечном итоге несет ответственность за назначенную антимикробную терапию, он должен быть абсолютно уверенным в эффективности и безвредности назначаемого средства коррекции микробиоценоза кишечника.

Очень важно, чтобы результаты теоретических и экспериментальных, фундаментальных и прикладных исследований нашли понимание у разработчиков современных эффективных и безопасных препаратов, воздействующих на нарушенное патогенетическое звено саморегуляции — микробиоту кишечника. Выбор такого средства — это уже прерогатива лечащего врача, за которым остается окончательное решение о назначении средства коррекции, которое будет эффективно стимулировать восстановление у больного собственной индивидуальной микробиоты с весьма специфическим качественным и количественным составом.

Выводы

Микробиота пищеварительного тракта, включающая более 5000 видов микроорганизмов, является очень важным дискретным органом, выполняющим множество функций, крайне необходимых для здоровья организма. Нарушение структуры микробиоценоза кишечника проявляется дисбиозами, приводящими к расстройству симбионтного пищеварения, которое является, в свою очередь, причиной многих развивающихся в организме человека системных и локальных патологических процессов. Лечебные мероприятия по коррекции дисбиозов предусматривают применение препаратов коррекции нарушений микробиоценоза кишечника. Самую многочисленную группу таких препаратов составляют пробиотики. Проведенные исследования убедительно доказали, что использование традиционных пробиотических препаратов на основе живых микроорганизмов является не самым эффективным и безопасным путем коррекции микробиоценоза кишечника.

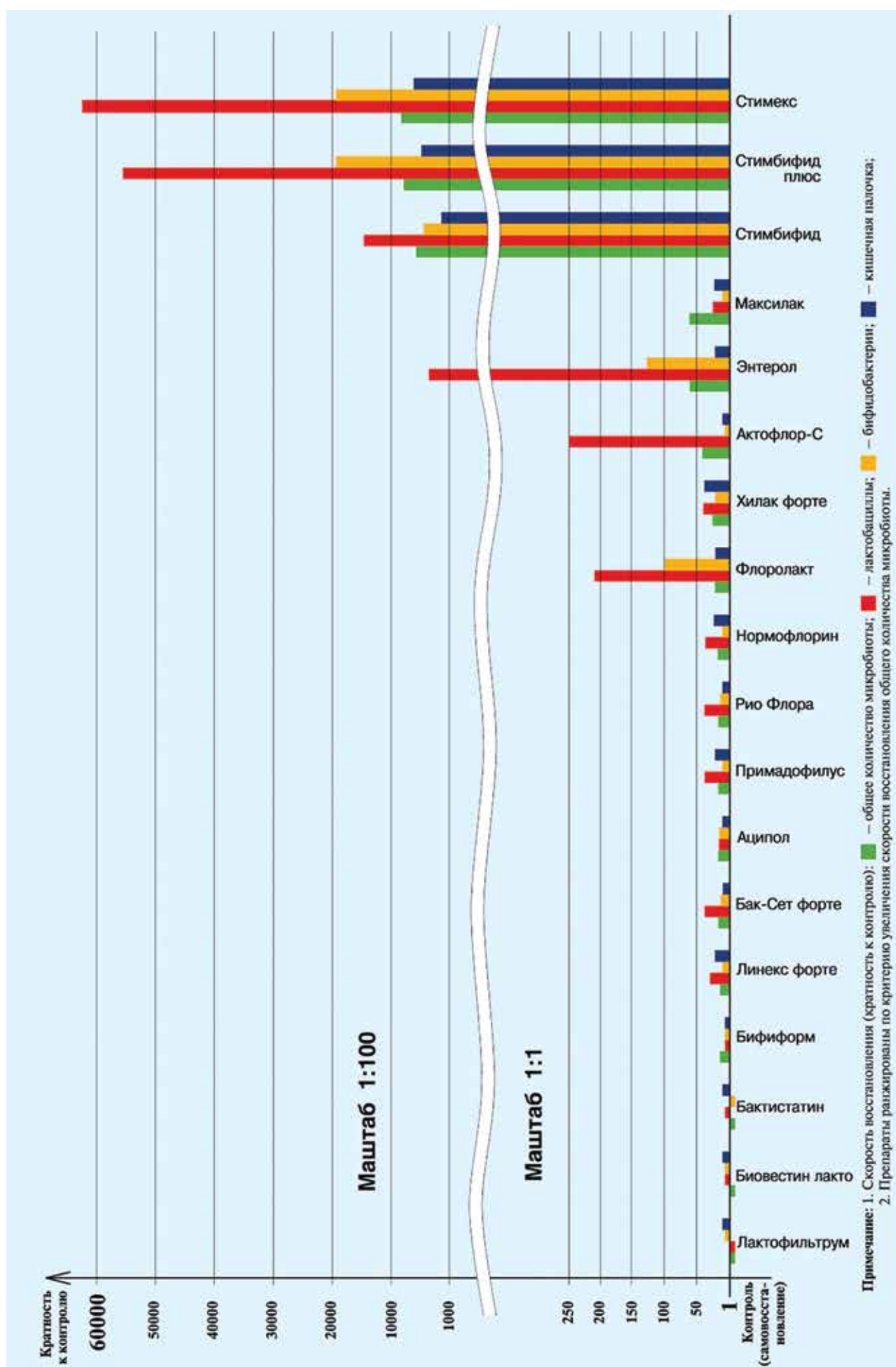


Рис. 2. Сравнительная экспериментальная оценка эффективности современных пробиотиков, пребиотиков и синбиотиков при коррекции нарушений микробиоценоза кишечника у животных с антибиотико-ассоциированным дисбиозом

Показано, что пробиотические микроорганизмы *L. plantarum* 8P-A3 (Rif^r), поступившие перорально в организм человека, существуют своей самостоятельной жизнью, находясь в антагонистических отношениях с индигенной кишечной микробиотой как в условиях нормобиоценоза, так и дисбиоза кишечника добровольцев, испытывая на себе эффект бионесовместимости по типу «хозяин против пробиотика».

Низкая эффективность мероприятий по коррекции дисбиотических нарушений кишечной микробиоты путем применения пробиотиков является основанием пересмотра стратегии поддержания и восстановле-

ния индивидуальной кишечной микробиоты, которая сформировалась после рождения человека.

В этой связи представляется целесообразным дальнейшее развитие доказательной основы определения эффективности и безопасности создаваемых средств коррекции нарушений кишечной микробиоты с обязательным проведением экспериментов на животных и подтверждением полученных данных клиническими испытаниями. Такая последовательность действий во многом будет содействовать улучшению качества и эффективности препаратов, повысит их безопасность, а также доверие к ним со стороны врачей и пациентов.

The intestinal microbiota as a discrete organ, which is named in the scientific literature the «paracytological system» [1], plays a significant role in the vital activity of the host body: metabolism, detoxification, formation of innate immunity, development of colonization resistance against pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms at the first stage of the infectious process development [2, 3, 4]. The knowledge about the role of the intestinal microbiota is constantly extending and renewing towards an acquisition of new data about its functions as well as properties, which gave grounds to regard the intestinal microbiota as the main biogenic factor determining health or disease development [5]. An imbalance in the above-mentioned system due to intake of antimicrobials, changes in the habitat and nutrition character, gastroenterological diseases as well as an impact of other factors leads to the development of the clinico-laboratory syndrome — dysbiosis [6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14].

A range of tools for prophylaxis and treatment of disbiotic intestinal microbiocenosis disorders is quite wide. For more than 50 years, a special place in it has been given to probiotics — preparations containing live microorganisms that are representatives of the normal colon microbiota [6, 7]. It is remarkable that only after decades of using probiotics in Russia, the Resolution of the Expert Council of 07.11.2015 on the effectiveness, safety and regulatory aspects of the use of probiotics in the Russian Federation and other countries [15] acknowledged on the basis of scientific publications (although with reservations), the possibility of the appearance of systemic infections (endocarditis, sepsis, meningitis, bacteremia, pneumonia), caused by lactobacilli when using probiotics.

According to Besselink, M.G.H [16], in 2004–2007, 15 clinics of the University Medical Center Utrecht (Netherlands) studied an effect of the multispecies probiotic preparation on reduction of the risk of infectious complications in 296 patients with pancreatitis in the multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. During treatment, 24 patients in the group that received the probiotic died. In the control group of patients, who did not intake the probiotic, the mortality was 2.5 times lower.

The reasons for this are still unknown; however, in October 2015, the similar study carried out in the Czech Republic was terminated on the insistence of the Dutch scientists.

The group of Russian scientists did the experimental research with the aim of revealing a possible cause of lethal cases in patients of the university clinics, which gave evidence about the biologically hazardous potential of probiotic preparations. In the course of the investigations with the use of the laboratory animals, it was found that the potential hazard of probiotics consists in the ability of foreign microorganisms in their composition to initiate the translocation (transfer into the foreign biotope) of the intestinal microbiota into the blood stream and abdominal cavity due to the increased antigenic and allergenic load, which resulted in the death of more than 30 % of the experimental animals associated with the infectious toxic (endotoxic) shock with the development of bacteremia and peritonitis [17, 18].

Therefore, the practice of clinical and experimental investigations clearly showed the problem of effectiveness and safety of probiotics. Only in 2015, did the experts acknowledge the fact of the potential hazard of probiotics [15]; however, the results of the experimental studies published in 2005–2006 [19, 20], brought the scientists closer to understanding the fact that a single statement about the presence or absence of effectiveness of probiotic therapy or its transitory character is absolutely insufficient.

It was found that in violation of standards, to which probiotics have to correspond [7], their effectiveness in the animal experiments (as required by the United Nations Ethics Committee) was often not proved (Fig. 1). Primarily, there should be correspondence to the standards of microorganisms in the composition of preparations, which, in particular, have to be protected from an impact of the digestive enzymes and bile. Their effectiveness and safety for humans have to be proved experimentally; the genetic stability of microbial properties should be guaranteed; high quality lyophilization of microorganisms has to provide the high survival rate after peroral intake of probiotics.

In fact, immediately after the theoretical substantiation of inclusion of one or another microorganism as promis-

ing for creation of a probiotic preparation on its basis, all activity of developers switched over the biotechnology of a new preparation and its promotion onto the market of probiotics.

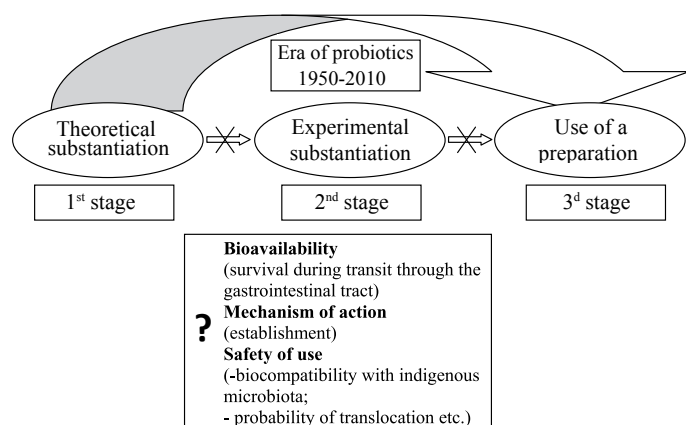


Fig. 1. Traditionally established sequence of actions in development of probiotic preparations

The second very important stage of pre-clinical experimental substantiation of safety, harmlessness and effectiveness of microorganisms and supplementary ingredients included in the composition of probiotic preparations was excluded (with the tacit agreement) from the logical chain of actions in development and clinical trials of a preparation itself. This led to the following problems in clinical trials associated not only with an increase in dysbiosis in the population despite a significant range of probiotic preparations, but also with their safety.

Over a long period of time, there was no method for determination of bioavailability of probiotic microorganisms (survival during transit through the gastrointestinal tract); the mechanism of action of probiotic microorganisms (substitutive action, that is, the establishment in a biofilm of the intestinal mucosa) was not recognized; the safety of the use of probiotic preparations (biocompatibility of microorganisms in a probiotic composition with indigenous microbiota, the possibility of its translocation through the intestinal walls etc.) was not proved.

This problem was successfully solved by a group of Russian scientists, who developed, first of all, the universal method for differentiation of probiotic and indigenous microorganisms by obtaining labeled derivatives of probiotic bacteria isolated from intestinal contents of laboratory animals that stably inherited a trait of rifampicin resistance and preserved species characteristics [14, 17, 18, 21, 22, 23, 24, 25].

Secondly, an express method was developed, which enabled initiation of intestinal dysbiosis in the study on experimental animals [24, 25, 26, 27, 28].

Thirdly, in 2012, a universal indicator was introduced into the scientific use for the first time. The indicator characterizes the quantitative changes in the intestinal microbiota in animals in an experiment under an effect of the means of microbiocenosis correction, namely, «the rate of intestinal microbiota recovery» [27, 28]. The universal-

ity of the indicator resides in the fact that it is possible to assess with its help an effect of both positive (the rate of recovery) and negative (the rate of inhibition) factors on total microbial content and the number of individual representatives of the intestinal microbiota. This integrative indicator, which includes all complex of factors affecting the intestinal microbiota, enables obtaining the quantitative characteristics of the process of recovery (inhibition) of the intestinal microbiota ($\text{CFU} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$) compared with the similar indicator that is determined in the control experiment on animals upon self-recovery of their intestinal microbiocenosis (ratio to control).

The results of the *in vitro* experiments on the study of bifidobacteria and lactobacilli survival in the gastric juice and duodenal contents of humans [29] show that during incubation of bifidobacteria and lactobacilli in the indicated biological media, the quantity of viable probiotic microorganisms was significantly reduced compared to their initial quantity up to individual cells in case of bifidobacteria.

A significant decrease (by 4–7 orders) in the number of the probiotic microorganisms entering the organism of the experimental animals was established [21]. These data confirm the results of the previous studies *in vitro* [30, 31] about extremely low survival of probiotic microorganisms in the aggressive media.

In the context of the above mentioned, it is necessary to note the results of the experiments, which were published in the work [32]. According to the presented data, removal of probiotic microorganisms from the commercial biocomplex «Normoflorin-B1» increased the effectiveness of the preparation regarding recovery of normobiota in animals with antibiotic-associated dysbiosis almost by 60 times, and the live bacteria *per se*, which were removed from the biocomplex, did not have an ability to stimulate recovery of the intestinal microbiota when administered enterally to the animals with antibiotic-associated dysbiosis. Therefore, it was proved experimentally that not probiotic microorganisms but their metabolites made a significant contribution to normalization of the intestinal microbiocenosis disorder [32, 33].

It can be stated that in the course of the transit through the digestive tract of the experimental animals, the number of probiotic microorganisms decreases to the value lower than critical, after which population survival, in general, is impossible. This data supported by the results of the study on species, tissue and individual specificity as well as heterology of probiotic bacteria for the organism of a new host [18], their incompatibility with his/her residential microbiota indicate ecological and functional marginality of probiotic microorganisms [34] and impossibility to change with their help inherent microbiota, which was already formed at birth both in healthy individuals [35], and in individuals with disbiotic changes in the intestinal microbiota [33, 36].

The published results of the experimental studies on laboratory animals, which demonstrated on the factual

material the necessity to change the view on the problem of probiotics and probiotic therapy for the sake of patients' health, were not disproved. The opponents expressing their doubts state that the data obtained on laboratory animals should not be extrapolated to humans. Pediatricians are especially skeptical asserting that everything is different in children (children are not mice!) and constantly emphasizing the necessity to carry out studies with participation of volunteers to achieve full clarity in solving this complex problem.

Indeed, this problem required solving several theoretical, methodological and organizational problems at the first stage of investigations; in particular, obtaining spontaneous rifampicin resistant (Rif^r) mutants of probiotic lactic acid bacteria *L. plantarum* 8P-A3 with stably inherited species characteristics and a trait of antibiotic resistance (R-trait), growing them on the special culture media; adapting to human volunteers the method for initiation of experimentally antibiotic-associated dysbiosis that was developed for mice; detecting the representatives of the intestinal microbiota and marked according to the R-trait lactic acid bacteria *L. plantarum* 8P-A3 in faeces of laboratory animals and volunteers using selective solid culture media, their quantification in 1 g of faeces; comparatively assessing the effectiveness of modern methods regarding correction of intestinal microbiota at experimental antibiotic-associated dysbiosis both in laboratory animals and human volunteers.

Before consideration and assessment of our own experimental results, it is necessary to note that developers and producers who have been engaged in probiotic therapy for decades, regarded all microorganisms isolated from healthy people as «good and healthy», and, therefore, promising for the use in the biotechnology of probiotics.

They, as well as physicians and patients, had a priori beliefs about probiotics as preparations with curative and prophylactic activities, which can be included into the treatment regimen for most diseases without experimental trial on animals of their effectiveness and safety.

It has turned out that this belief is far from the reality as it is the questions of effectiveness and safety of probiotic microorganisms as well as the regulatory aspects of their use that were discussed in the special session of the Expert Council in November 2015 in Moscow [15]. Based on the results of the session, the experts stated in the Resolution that probiotics are live microorganism, which upon administration in adequate doses have a positive effect on human health.

The Resolution of the Expert Council [15] and the appeal of the experts to the professional medical community with a proposal to discuss the main problems that have arisen over the last years indicate that these questions have accumulated much faster than solutions have been found.

In the light of the results of the experimental studies that point to the involvement of the probiotic microorganisms to initiation of the intestinal microbiota translocation

[17, 18], the warning of M.D. Ardatsky and O.N. Minushkin [37] expressed as far back as in 2006 is perceived differently.

The authors are sure that it is necessary to take into consideration a potential hazard of the intestinal microbiota and its metabolites, when translocation of microorganisms into the non-residential biotopes and sterile cavities occurs. According to the data of the cited authors, penetration of the intestinal microbiota into the abdominal cavity leads to its infection and development of spontaneous peritonitis. With that, the mortality of patients with liver cirrhosis of B and C classes by Child-Pugh in this case reaches 50 %, while 69 % of patients had a recurrence within a year.

In a series of publications [14, 21, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 34], which contain the results of their own experimental investigations, a group of the Russian scientists also actually appeals to the professional medical community with a proposal to look differently at the problem of probiotics and probiotic therapy.

Recently, the strategy for intestinal microbiota maintenance was reconsidered: the conclusive evidence was obtained with regard to the fact that the use of the traditional preparations (probiotics) based on live microorganisms is not the most effective and safe way for correction of microecological disorders in the intestine.

Low survival of lyophilized microorganisms (in capsules or in flasks) in the composition of probiotic preparations has been established experimentally: when plating suspensions of rehydrated lyophilized probiotic preparations (within the shelf life) on the special solid culture media, survival of microorganisms is 15–25 % of the total number of «live microorganisms» specified in instructions. Only insignificant part of remained probiotic microorganisms does reach colon, which results, among other things, in their low survival during the transit through the intestine — less than ten-thousandths of a percent of the initial quantity entered the stomach in the composition of the preparation. It was also proved that in the intestine, even at dysbiosis, viable indigenous strains (auto-strains) continue to reside and a probiotic that was created on the basis of any biotechnological «universal» strain is heterologous (foreign) and enters the antagonistic relations with auto-strains.

It is also necessary to take into account that probiotic microorganisms entered into the intestine have the lymphocytotoxic activity [38,39], which affects an ability of the patient's immune system to detect, which microorganisms (indigenous or foreign) enter the gastrointestinal tract. The presence of the undesirable for live organism properties in probiotic microorganisms points once more to a necessity of the individual approach to selection of a probiotic, the right choice of the course and single doses of a preparation.

At the first stage of our own research, carried out on animals and volunteers (8 individuals, one of whom was placebo-controlled) without the signs of the intestine microbiocenosis disorder, the transitory character of the

Table 1. Survival of lactic acid bacteria *L. plantarum* 8P-A3 (Rif^r) during transit through the gastrointestinal tract of healthy white mice, guinea pigs and humans

White mice			Guinea pigs			Volunteers		
Daily dose, CFU	Numbers in faeces, CFU · g ⁻¹ ($\bar{x}$ at 2–10 days)	Survival of micro-organisms, % (proportion)	Daily dose, CFU	Numbers in faeces, CFU · g ⁻¹ ($\bar{x}$ at 2–10 days)	Survival of micro-organisms, % (proportion)	Daily dose, CFU	Numbers in faeces, CFU · g ⁻¹ ($\bar{x}$ at 2–10 days)	Survival of micro-organisms, % (proportion)
5.2·10 ⁷	175.1	0.0000034 (3.4·10 ⁻⁶)	5.3·10 ⁸	83.1	0.00000016 (1.6·10 ⁻⁷)	2.0·10 ¹⁰	159.2	0.000000008 (8.0·10 ⁻⁹)

presence of labeled (rifampicin resistant — Rif^r) lactobacilli in the gastrointestinal tract of animals and humans as well as low level of bacteria shedding with faeces were revealed (Table 1).

At the same time, an important regularity was revealed: survival of lactic acid bacteria *L. plantarum* 8P-A3 (Rif^r) in the body of guinea pigs was lower than in the body of white mice, while survival in the gastrointestinal tract of volunteers was lower than in the body of white mice and guinea pigs.

The reason for the difference in survival of lactic acid bacteria *L. plantarum* 8P-A3 (Rif^r) in the gastrointestinal tract of white mice, guinea pigs and volunteers, in our opinion, is the length of the intestine: with an increase in the length of the intestine (white mice — guinea pigs — volunteers) and the time of bacteria transit through the gastrointestinal tract, the numbers of lactobacilli decreased from 0.0000034 % (in the intestine of white mice) to 0.00000016 % (in the intestine of guinea pigs) and to 0.000000008 % in humans.

It is necessary to note another fact: the active phase of lactic acid bacteria *L. plantarum* 8P-A3 (Rif^r) shedding from the body of volunteers lasted up to 5 days, while in white mice and guinea pigs it was up to 15 days.

At the second stage, the investigations were carried out on animals and volunteers with antibiotic-associated intestine dysbiosis induced by gentamicin peroral administration. The daily dose of gentamicin peroral administration was calculated for animals on the basis of the daily dose for humans with consideration for conversion coefficient.

In the course of the investigations, the process of recovery of indigenous lactobacilli under an influence of the peroral administration of labeled probiotic lactic acid bacteria *L. plantarum* 8P-A3 (Rif^r) and possibility of survival of the latter in the intestine during their transit were studied. Based on the data of the quantification by the bacteriological method of the total microbial count and the number of individual representatives of the intestinal microbiota in the intestine of animals and volunteers, it is possible to suggest the development of the third stage of intestinal dysbiosis by I.K. Maksimov [40] or the third decompensated uncomplicated degree of dysbiosis by O.N. Minushkin et al. [7].

The bacteriological study of faeces from animals and volunteers during the experiment gives grounds to suggest two processes in animals: on one hand, a slow increase in the numbers of indigenous lactobacilli (the recovery rate

of the intestinal microbiota on the 12th day of the experiment was 1.3·10⁴ CFU·g⁻¹·day⁻¹ for white mice and 7.2·10⁴ CFU·g⁻¹·day⁻¹ for guinea pigs), and on the other hand, an increase in the number of the probiotic lactic acid bacteria *L. plantarum* 8P-A3 (Rif^r) in the intestinal contents in the first two days of their peroral administration, but quite a fast decrease and full elimination by 13–14 days of observation.

Lactic acid bacteria *L. plantarum* 8P-A3 (Rif^r) in the quantity of several tens in 1 g of faeces were found in all 7 volunteers from 4 to 8 days (with delay of 2 days compared to animals). From the 9th day, immediately after termination of the per os intake of lactic acid bacteria *L. plantarum* 8P-A3 (Rif^r), they were not detected any more in the faeces of three volunteers and, subsequently, the number of probiotic lactic acid bacteria *L. plantarum* 8P-A3 (Rif^r) sharply reduced in the faeces of all volunteers; by the 12th day (the 4th day after termination of intake), labeled lactobacilli were not isolated.

The average value of the indicators of the recovery rate of indigenous lactobacilli in the volunteers from the experimental group (1.2·10⁵ CFU·g⁻¹·day⁻¹) practically did not differ from the rate of self-recovery of indigenous lactobacilli in the volunteer (biocontrol) (3.8·10⁵ CFU·g⁻¹·day⁻¹) in the placebo controlled investigation, which suggests the absence of the probiotic effect of the peroral administration of probiotic lactobacilli.

The presented results give grounds to suggest that probiotic lactic acid bacteria *L. plantarum* 8P-A3(Rif^r) being in the human digestive tract, do not exert their potential abilities to stimulate recovery, at least, regarding indigenous lactobacilli. It is obvious that in the body of volunteers as well as in the body of white mice and guinea pigs, probiotic lactobacilli remain to be foreign, do not survive in the intestine, do not multiply, do not produce their natural metabolites and do not have a stimulating effect on the indigenous microbiota.

In the conditions of antibiotic-associated dysbiosis, the maximum number of lactic acid bacteria *L. plantarum* 8P-A3 (Rif^r) in the faeces of all volunteers was observed on the 4–8th days from the beginning of per os intake; however, already one day after the last intake of lactobacilli, on the background of an increase in the number of the indigenous intestinal microbiota and natural enhancement of its antagonism, they were not found in the faeces of 3 of 7 volunteers, and on the 4th day after termination of intake, lactic acid bacteria *L. plantarum* 8P-A3 (Rif^r) were

not detected by the bacteriological method in the faeces of all volunteers, similar to what was observed in the experiment in the conditions of intestinal normobiosis.

The results of the study showed that:

- the intestinal microbiota effectively counteracted colonization of the intestine by foreign microorganisms.
- the behavior of probiotic microorganisms was identical in the body of the experimental animals and humans.

We also carried out the comparative experimental study on the effectiveness of modern preparations that are frequently used in clinical practice as well as recent innova-

tive commercial and experimental preparations (Actoflor-C, Stimbifid plus, Stimex) regarding intestinal microbiota recovery at antibiotic-associated dysbiosis in conventional white mice. The characteristics of the preparations are given in Table 2.

The effectiveness of the peroral administration of probiotics was assessed by the rate of recovery of the intestinal microbiota in animals of the experimental groups compared to the rate of self-recovery of microbiota: the total microbial count, $1.8 \cdot 10^5$ CFU·g⁻¹·day⁻¹; lactobacilli, $2.9 \cdot 10^3$ CFU·g⁻¹·day⁻¹; bifidobacteria, $1.0 \cdot 10^4$ CFU·g⁻¹·day⁻¹; Esche-

Table 2. The characteristics of the modern preparations

No.	Preparation name	Preparation type	Composition	Shelf life, %
1	Actoflor-C, series 020316	Metabiotic of the new generation	Complex of amino acids and organic acids — analogues of metabolites of probiotic microorganisms	94
2	Acipol, series 010116	Probiotic	Live acidophilic bacteria, not less than $1 \cdot 10^7$ CFU per capsule	87
3	Bac-Set forte, lot 1091105	Multi-probiotic	<i>L. casei</i> PXN37, <i>L. plantarum</i> PXN47, <i>L. rhamnosus</i> PXN54, <i>B. bifidum</i> PXN23, <i>B. breve</i> PXN25, <i>B. longum</i> PXN25, <i>L. acidophilus</i> PXN35, <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> PXN63, <i>Streptococcus thermophilus</i> PXN66, <i>B. infantis</i> PXN27, <i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> PXN39, <i>L. helveticus</i> PXN45, <i>L. salivarius</i> PXN57, <i>L. fermentum</i> PXN44, not less than $2 \cdot 10^9$ CFU per capsule	79
4	Bactistatin, lot 090915	Metabiotic	Biologically active metabolites of cell-free culture liquid <i>B. subtilis</i> 3, vitamin E and hydrolysate of soya flour	87
5	Biform, series 283236	Probiotic	<i>Enterococcus faecium</i> $1 \cdot 10^7$ CFU, <i>Bifidobacterium longum</i> $1 \cdot 10^7$ CFU per capsule	66
6	Biovestin lacto, Certificate of State Registration No RU.77.99.11.003.E. 044981. 10.11 of 31.10.2011	Probiotic	<i>Bifidobacterium adolescents</i> $1 \cdot 10^8$ CFU /ml, <i>Lactobacillus plantarum</i> $1 \cdot 10^8$ CFU /ml and the products of their metabolism	70
7	Lactofiltrum, series 2101015	Prebiotic	Amicrobic preparation, contains lignin hydrolysed, lactose, cellulose microcrystalline	86
8	LINEX Forte, series FR4472	Probiotic	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA 5 13,8 mg, <i>Bifidobacterium animalis ssp. lactis</i> BB12 4,2 mg per capsule	75
9	Maxilac, series 8546308	Multi-probiotic + prebiotic	One capsule contains lyophilisate of probiotic bacteria ($4.5 \cdot 10^9$ CFU) and prebiotic component oligofructose (63 mg). Lyophilisate of bacteria: <i>L. helveticus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. breve</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>B. bifidum</i>	83
10	Normoflorin -L, series 0218	Synbiotic	Lactic acid bacteria (<i>L. acidophilus</i>) not less than $1 \cdot 10^9$ CFU per ml of culture; products of bacterial metabolism	70
11	Primadophilus series 20050416	Probiotic	Lyophilized bacteria <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> ($2,9 \cdot 10^9$ CFU per capsule)	79
12	Rioflora, series EF 0497	Multi-probiotic + prebiotic	Probiotic microorganisms (in one capsule: not less than $5 \cdot 10^8$ CFU /g): <i>B. bifidum</i> W 23, <i>B. lactis</i> W 51, <i>L. acidophilus</i> W37, <i>L. paracasei</i> W20, <i>L. plantarum</i> W62, <i>L. rhamnosus</i> W71, <i>L. salivarius</i> W24 with inclusion of prebiotic components — inulin, fructooligosaccharides	63
13	Stimbifid, series 010316	Prebiotic	Oligofructose, inulin, vitamin-mineral premix «Immunity», microelements — zinc, selenium	94
14	Stimbifidplus, series 010616	Metaprebiotic (Metabiotic + prebiotic)	Fructooligo- and fructopolysaccharides, calcium lactate. RF patent	98
15	Stimex, experimental series	Metaprebiotic (metabiotic + prebiotic)	Innovative experimental complex containing metabiotic and prebiotic components. RF patent	97
16	(Hylak forte), series R21664	metabiotic	Germ-free aqueous substrate of metabolic products of <i>E. coli</i> DSM 4087, <i>S. faecalis</i> DSM 4086, <i>L. acidophilus</i> DSM 4149, <i>L. helveticus</i> DSM 4183	81
17	Florolact, series 710615	Prebiotic	Gum arabic, fructooligosaccharides, lactitol (lactinol)	62
18	Enterol, series 1615	Probiotic	In one capsule, 250 mg of lyophilized saccharomycetes <i>Saccharomyces boulardii</i>	86

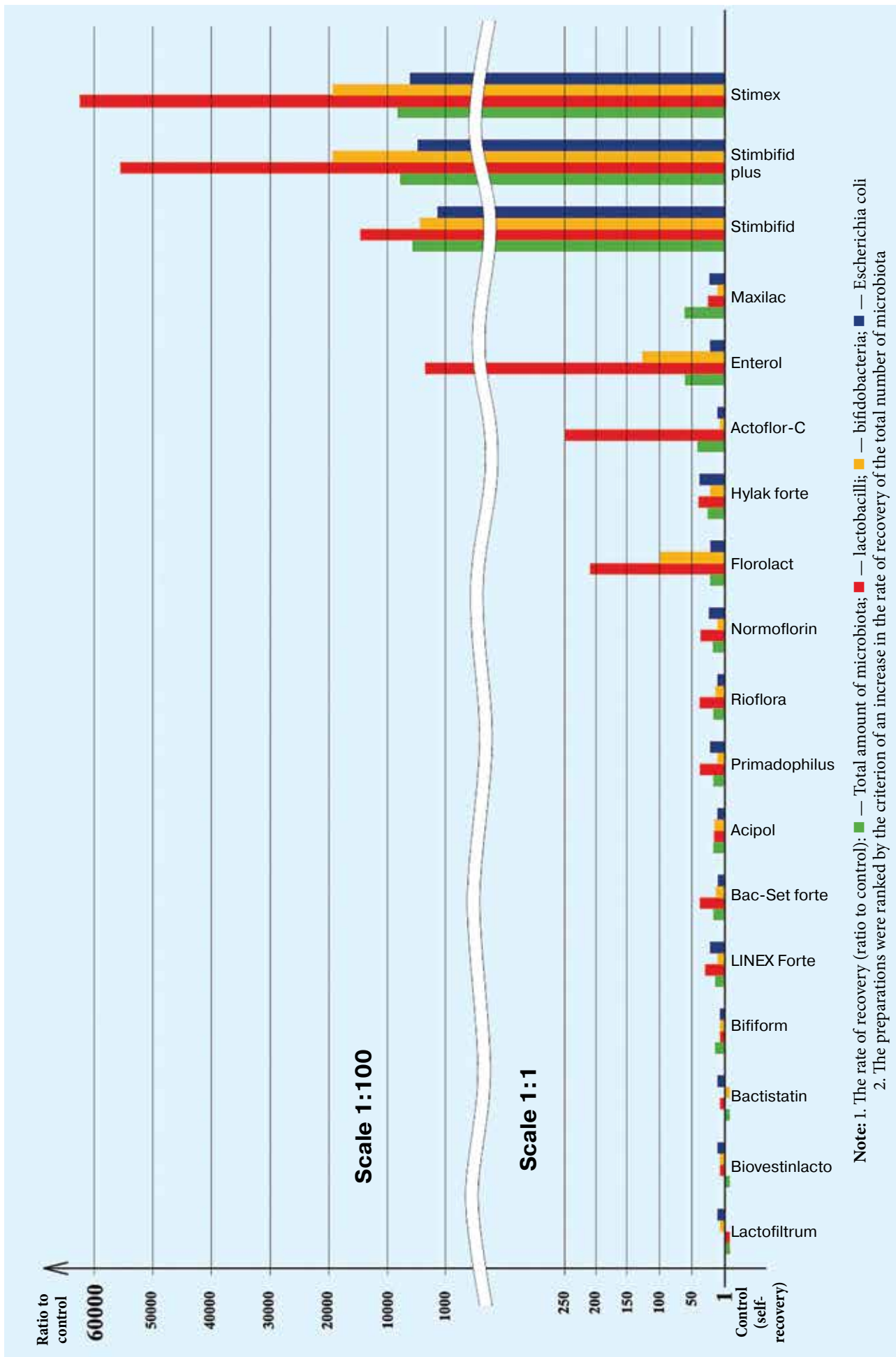


Figure 2. Comparative experimental assessment of the effectiveness of modern probiotics, prebiotics, synbiotics and metabiotics in correction of the intestinal microbiocenosis disorders in animals with antibiotic-associated dysbiosis

richia, $3.3 \cdot 10^3$ CFU·g⁻¹·day⁻¹ in the animals from the control group, which did not receive preparations per os (the rate of self-recovery of the total microbial count and the individual representatives of microbiota was taken as 1).

The summarizing data on the comparative assessment of the effectiveness of the modern means for correction of the intestinal microbiocenosis disorders in conventional white mice with antibiotic-associated dysbiosis are presented in Figure 2.

As follows from Figure 2, there are significant differences in the effectiveness of the studied modern means for correction of the intestinal microbiota disorders regarding intestinal microbiota recovery in conventional white mice with antibiotic-associated dysbiosis. Among 18 preparations, only 3 (Stimbifid, Stimbifid plus and Stimex) were significantly superior by the rate of intestinal microbiota recovery compared to the control animal group (self-recovery of the intestinal microbiota).

By the rate of intestinal microbiota recovery, 11 preparations were at the level of its self-recovery or slightly higher, and 3 preparations selectively stimulated the growth of lactobacilli.

Therefore, a necessity of the most effective and safe recovery of the autochthonous (indigenous) intestinal microbiota by the use of prebiotics and metabiotics, and their compositions — metaprebiotics was scientifically substantiated and experimentally proved.

Complete information about preparations intended for correction of intestinal microbiocenosis is critical for a physician. And similar to the case of administration of antimicrobials when physicians are ultimately responsible for prescribed antimicrobial therapy, they have to be absolutely sure in the effectiveness and safety of a prescribed preparation for correction of the intestinal microbiocenosis.

It is very important that the results of the theoretical and experimental, fundamental and applied studies find understanding in developers of the modern effective and safe preparations that affect the disturbed pathogenetic element of self-regulation — the intestinal microbiota. The choice of such means is a prerogative of a physician, who takes the final decision about prescription of the correction means, which will effectively stimulate recovery

of the patient's autochthonous (indigenous) individual microbiota with highly specific qualitative and quantitative composition.

Conclusions

The microbiota of the digestive tract, which includes more than 5000 species of microorganisms is a very important discrete organ having many functions that are crucial for body health. Disturbance of the intestinal microbiocenosis structure is manifested as dysbiosis leading to symbiotic digestion disorder, which, in turn, is a cause of many systemic and local pathological processes developing in the human body. Treatment measures on correction of dysbiosis envisage the use of the preparations to correct intestinal microbiocenosis. The most numerous group of these preparations consists of prebiotics. The performed investigations proved conclusively that the use of the traditional probiotic preparations based on live microorganisms is not the most active and safe method for correction of microecological disorders in the intestine.

It was shown that after peroral administration to humans, probiotic microorganisms *L. plantarum* 8P-A3 (Rif^r) lived their own life being in the antagonistic relations with the indigenous intestinal microbiota both in the conditions of normobiocenosis and dysbiosis of the volunteers' intestine experiencing the effect of bio-incompatibility of the «host against probiotic» type.

The low effectiveness of measures for correction of dysbiotic disorders of the intestinal microbiota by using probiotics gives grounds for revision of the strategy of maintenance and recovery of the individual intestinal microbiota, which was formed after birth.

In this connection, it seems expedient to further develop the evidential basis for detection of the effectiveness and safety of the created means for correction of the intestinal microbiota disorders with the obligatory conduction of the experiments on animals and confirmation of the obtained data with the clinical trials. This sequence of action to a large extent will facilitate an improvement in quality and effectiveness of preparations, increase in their safety as well as physicians' and patients' confidence in them.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Николаев, Ю.А., Плакунов, В.К. (2007). Биопленка — «город микробов» или аналог многоклеточного организма? *Микробиология*, 76(2), 149–163.
2. Gorbach, S.L. (1986). Function of the normal human microflora. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 18(Suppl.49), 17–30.
3. Tannock, G.W. (1988). The normal microflora: new concepts in health promotion. *Microbiological Sciences*, 5(1), 4–8.
4. Neish, A.S. (2009). Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*, 136(1), 65–80.
5. Симонова, Е.В., Пономарева, О.А. (2008). Роль нормальной микрофлоры в поддержании здоровья человека. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*, 83(8), 20–25.
6. Циммерман, Я.С. (2013). Эубиоз и дисбиоз желудочно-кишечного тракта: мифы и реалии. *Клиническая медицина*, 91(1), 4–11.
7. Минушкин, О.Н., Елизаветина, Г.А., Ардатская, М.Д. (2013). Нарушение баланса микрофлоры и ее коррекция. *Эффективная фармакотерапия. Гастроэнтерология*, 4, 4–8.
8. Воробьев, А.А., Абрамов, Н.А., Бондаренко, В.Н., Шендеров, Б.А. (1997). Дисбактериозы — актуальная проблема медицины. *Вестник Российской академии медицинских наук*, 3, 4–7.
9. Бондаренко, В.Н., Мацулевич, Т.В. (2007). Дисбактериоз кишечника как клинико-лабораторный синдром: современное состояние проблемы. М., ГЭОТАР — Медиа.— 304 с. ISBN 978–5–9704–0430–0
10. Циммерман, Я.С., Циммерман, И.Я. (2005). Антибиотико-ассоциированная диарея и псевдомембранозный колит — суть клинически манифестные формы кишечного дисбиоза. *Клиническая медицина*, 83(12), 12–19.

11. Барановский, А.Ю., Кондрашина, Э.А. (2000). Дисбактериоз и дисбиоз кишечника. СПб., Питер. — 224 с. ISBN5-272-00164-8
12. Отраслевой стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (ОСТ 91599.11.004-2003), утв. Приказом № 231 Минздрава РФ от 09.06.03 г. — М.:2003.
13. Dunne, C., Murphy, L., Flinn, S., O' Mahony, L., O' Halloran, S., Feeney, M et al. (1999). Demonstration of functionality in animal modelsof disease and in human clinical trials. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 76(1-4), 279-292.
14. Чичерин, И.Ю., Дармов, И.В., Погорельский, И.П., Лундовских, И.А., Гаврилов, К.Е. (2013). Заместительное действие пробиотиков: миф или реальность. *Журнал международной медицины*, 4(5), 52-58.
15. Резолюция Экспертного Совета по вопросам эффективности, безопасности и регуляторным аспектам применения пробиотиков в РФ и других странах. *Инфекционные болезни*, 2015. 13(4), 53-56.
16. Besselink, M.G.H., van Santvoort, H.S., Buskens, E., Boermeester, M.A., van Goor, Y., Timmerman, H.M. et al. (2008). Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: A randomizes, double-blind, placebo-controlled trial. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*, 152(28), 1593-1594.
17. Чичерин, И.Ю., Погорельский, И.П., Лундовских, И.А., Дармов, И.В., Гаврилов, К.Е., Горшков, А.С., Маньшин, А.И. (2016). Транслокация кишечной микробиоты. *Журнал международной медицины*, 4(29), 87-100.
18. Чичерин, И.Ю., Погорельский, И.П., Лундовских, И.А., Дармов, И.В., Горшков, А.С., Шабалина, М.Р. (2016). Кишечная недостаточность и транслокация иерсиний псевдотуберкулеза (*Yersinia pseudotuberculosis*) при развитии экспериментальной генерализованной инфекции. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*, 3(127), 24-31.
19. Glushanova, N.A., Shenderov, B.A.(2005). Relationships between the probiotic and host indigenous lactobacilli under the conditions of mixed cultivation *in vitro*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii*, 2, 56-61.
20. Глушанова, Н.А. (2006). Экспериментальное обоснование новых подходов к коррекции микробиоценоза кишечника. Дисс. докт. мед. наук. Москва, Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии.— 260 с.
21. Дармов, И.В., Чичерин, И.Ю., Погорельский, И.П., Лундовских, И.А., Дурнев, Е.А. (2012). Выживаемость микроорганизмов пробиотиков в желудочно-кишечном тракте экспериментальных животных. *Журнал инфектологии*, 4 (1), 68-74.
22. Чичерин, И.Ю., Погорельский, И.П., Лундовских, И.А., Гаврилов, К.Е., Шабалина, М.Р., Дармов И.В. (2013). Аутопробиотикотерапия. *Журнал инфектологии*, 5(4), 43-54.
23. Пат. № 2528867. Способ оценки выживаемости бифидо — и лактобактерий в желудочно — кишечном тракте экспериментальных животных / Дармов И.В., Чичерин И.Ю., Погорельский И.П., Лундовских И.А., Янов С.Н. Оpubл. 20.09.2014, Бюлл. № 26.
24. Чичерин, И.Ю., Дармов, И.В., Погорельский, И.П., Лундовских, И.А. (2012). Микрофлора кишечника белых мышей и морских свинок при экспериментальном антибиотико-ассоциированном дисбактериозе и возможность его коррекции пробиотиком Стимбифид. *Журнал инфектологии*, 4(1), 75-80.
25. Пат. № 2477894. Способ моделирования дисбактериоза кишечника у лабораторных животных/ Дармов И.В., Чичерин И.Ю., Ердякова А.С., Лундовских И.А., Погорельский И.П. Оpubл. 20.03.2013, Бюлл. № 8.
26. Бредихин, В.Н., Поздняков, И.В., Чичерин, И.Ю., Погорельский, И.П., Лундовских, И.А., Лещенко А.А., Лазыкин А.Г. (2013). Микроэкологические изменения в кишечнике при дисбактериозе: экспериментальное обоснование возможности коррекции дисбиотических изменений пребиотиком Стимбифид. *Здоровье населения и среда обитания*, 12(249), 19-21.
27. Погорельский, И.П., Чичерин, И.Ю., Дармов, И.В., Лундовских, И.А., Гаврилов, К.Е. (2012). Пробиотики: вектор развития. *Практическая медицина*, 3(58), 180-188.
28. Пат. № 2483113. Способ оценки воздействия экзогенных факторов на микрофлору кишечника при его дисбиотических нарушениях/ Дармов И.В., Чичерин И.Ю., Погорельский И.П., Лундовских И.А., Янов С.И. Оpubл. 27.05.2013. Бюлл. № 15.
29. Чичерин, И.Ю., Дармов, И.В., Погорельский, И.П., Лундовских, И.А., Гаврилов, К.Е. (2012). Выживаемость бифидобактерий и лактобактерий в условиях *in vitro* в желудочном соке и дуоденальном содержимом людей. *Медицинский альманах*, 1, 57-59.
30. Дармов, И.В., Чичерин, И.Ю., Погорельский, И.П., Лундовских, И.А. (2011). Выживаемость микроорганизмов пробиотиков в условиях *in vitro*, имитирующих процесс пищеварения у человека. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*, 3, 6-11.
31. Погорельский, И.П., Дармов, И.В., Чичерин, И.Ю., Ердякова, А.С., Лундовских, И.А. (2011). Сравнительная оценка выживаемости микроорганизмов пробиотиков в составе коммерческих препаратов в условиях *in vitro*. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*, 9, 96-101.
32. Чичерин, И.Ю., Дармов, И.В., Лундовских, И.А., Погорельский, И.П., Лещенко, А.А., Куликова, Л.Е. (2014). Нужны ли коммерческим пробиотикам микробные клетки? *Журнал международной медицины*, 1(6), 12-18.
33. Shenderov, B.A. (2013). Metabiotics: novel idea or natural development of probiotic conception. *Microbiol Ecology in Health & Disease*. [Electronic resource: [http:// dx.doi.org/ 10.3402/mehd.v24i0.20399](http://dx.doi.org/10.3402/mehd.v24i0.20399). Access date 02.11.2017]
34. Погорельский, И.П., Чичерин, И.Ю., Лундовских, И.А. (2013). Экологическая и функциональная маргинальность пробиотических микроорганизмов. [Электронный ресурс: <http://gastroportal.ru/files/mikroflora.pdf>. Дата обращения 06.11.2017]
35. Lidbeck, A., Gustafson, I.A., Nard, C.E. (1987). Impact of *Lactobacillus acidophilus* supplement on the human oropharyngeal and intestinal microflora. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 19(5), 531-537.
36. Воробьев, А.А., Несвижский, Ю.В., Буданова, Е.В., Иноземцева, Л.О. (1995). Популяционно-генетические аспекты микробиологического фенотипа кишечника здорового человека. *Журналмикробиологии*, 4, 30-35.
37. Ардасткая, М.Д., Минушкин, О.Н. (2006). Современные принципы диагностики и фармакологической коррекции. *Гастроэнтерология, приложение к журналу Consilium Medicum*, 8, 1-25.
38. Ердякова, А.С., Чичерин, И.Ю., Лундовских, И.А., Погорельский, И.П. (2012). Экспериментальная оценка лимфоцитотоксического действия бифидобактерий и лактобактерий. *Практическая медицина*, 3(58), 194-196.
39. Чичерин, И.Ю., Дармов, И.В., Богачева, Н.В., Погорельский, И.П., Лундовских, И.А., Шевцов, А.Н. (2013). Исследование влияния больших доз пробиотика Бифидумбактерин и микроорганизмов аутофлоры кишечника на организм белых мышей и показатели клеточного иммунитета. *Медицинский Советник Поволжья*, 1(6), 85-90.
40. Максимов, И.К. (2004). Нарушение микробиоценоза на фоне полихимиотерапии у больных опухолевыми заболеваниями системы крови: новые методы диагностики и коррекции. *Фарматека*, 13, 79-84.

REFERENCES

1. Nikolaev, Yu.A., Plakunov, V.K. (2007). Biofilm — "cityofmicrobes" or an analogue of multicellular organisms? *Microbiology*, 76 (2), 149-163. (in Russian)
2. Gorbach, S.L. (1986). Function of the normal human microflora. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 18(Suppl.49), 17-30.
3. Tannock, G.W. (1988). The normal microflora: new concepts in health promotion. *Microbiological Sciences*, 5(1), 4-8.
4. Neish, A.S. (2009). Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*, 136(1), 65-80.
5. Simonova, E.V., Ponomareva, O.A. (2008). The role of normal microflora in supporting human health. *Sibirskij Medicinskij Zhurnal (Irkutsk)*, 83(8), 20-25. (in Russian)
6. Tsimmerman, Ya.S. (2013). Eubiosis and dysbiosis of gastrointestinal tract: myths and reality. *Clinical medicine*, 91(1), 4-11.
7. Minushkin, O.N., Elizavetina, G.A., Ardatskaya, M.D. (2013). Microbial dysbalance and its correction. *Effective Pharmacotherapy. Gastroenterology*, 4, 4-8. (in Russian)
8. Vorob'ev, A.A., Abramov, N.A., Bondarenko, V.N., Shenderov, B.A. (1997). Dysbacteriosis — the actual medical problem. *Annals of the Russian academy of medical sciences*, 3, 4-7. (in Russian)
9. Bondsrenko, V.N., Matsulevich, T.V. (2007). Intestinal dysbacteriosis as a clinic-laboratory syndrome: the current state of the problem. M.: Geostar — Media.—304 p. ISBN: 978-5-9704-0430-0 (in Russian)

10. Tsimmerman, Ya.S., Tsimmerman, I. Ya. (2005). Antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis are clinical manifest forms of intestinal dysbiosis. *Clinical medicine*, 83(12), 12–19. (in Russian)
11. Baranovskiy, A.Yu., Kondrashina, E.A. (2000). The intestinal dysbacteriosis and dysbiosis. St. Petersburg: Piter. — 224 p. ISBN5–272–00164–8 (in Russian)
12. The Branch Standard «Patient Management Protocol. Intestinal Dysbacteriosis» (OST 91500.11.0004–2003), approved by the order of the Ministry of Health of Russian Federation No. 231 of 09.06.2003. M.: 2003. (in Russian)
13. Dunne, C., Murphy, L., Flinn, S., O, Mahony, L., O, Halloran, S., Feeney, M. et al. (1999). Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 76(1–4), 279–292.
14. Chicherin, I.Yu., Darmov I.V., Pogorelsky I.P., Lundovskikh I.A., Gavrilov, K.E. (2013). Substitutive action of probiotics: myth or reality. *Journal of International Medicine*, 4(5), 52–58. (in Russian)
15. Resolution of the Expert Council of 07.11.2015 on the effectiveness, safety and regulatory aspects of the use of probiotics in the RF and other countries. *Infectious diseases*, 2015, 13(4), 53–56. (in Russian)
16. Besselink, M.G.H., van Santvoort, H.S., Buskens, E., Boermeester, M.A., van Goor, Y., Timmerman, H.M. et al. (2008). Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*, 152(28), 1593–1594.
17. Chicherin, I.Yu., Pogorelsky I.P., Lundovskikh I.A., Darmov I.V., Gavrilov, K.E., Gorshkov, A.S., Manshin, A.I. (2016). Translocation of the intestinal microbiota. *Journal of International Medicine*, 4(29), 87–100. (in Russian)
18. Chicherin, I. Yu., Pogorelsky, I.P., Lundovskikh, I.A., Darmov, I.V., Gorshkov, A.S., Shabalina, M.R. (2016). Intestinal failure and yersinia pseudotuberculosis translocation in the development of experimental generalized infection. *Experimental and clinical gastroenterology*, 3(127), 96–101. (in Russian)
19. Glushanova, N.A., Shenderov, B.A. (2005). Relationships between the probiotic and host indigenous lactobacilli under the conditions of mixed cultivation in vitro. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii*, 2, 56–61. (in Russian)
20. Glushanova, N.A. (2006). Experimental substantiation of new approaches to correction of the intestinal microbiocenosis. Dissertation for the scientific degree of doctor of technical sciences. Moscow, Research Institute of Epidemiology and Microbiology.— 260 p. (in Russian)
21. Darmov, I.V., Chicherin, I.Yu., Pogorelsky, I.P., Lundovskikh, I.A., Durnev, E.A. (2012). Survival of probiotic microorganisms in the gastrointestinal tract of experimental animals. *Journal of Infectology*, 4 (1), 68–74. (in Russian)
22. Chicherin, I.Yu., Pogorelsky, I.P., Lundovskikh, I.A., Gavrilov, K.E., Shabalina M.R., Darmov, I.V. (2013). Autoprobiotic therapy. *Journal of Infectology*, 5(4), 43–54. (in Russian)
23. Darmov I.V., Chicherin I.Yu., Pogorelsky I.P., Lundovskikh I.A., Yanov S.N. The method for assessment of bifido- and lactobacteria survival in the gastrointestinal tract of experimental animals. Patent RF, no. 2528867, 2014. (in Russian)
24. Chicherin, I.Yu., Darmov, I.V., Pogorelsky, I.P., Lundovskikh, I.A. (2012). Intestinal microflora of white mice and guinea pigs in experimental antibiotic-associated dysbacteriosis and the possibility of its correction with prebiotic Stimbid. *Journal of Infectology*, 4(1), 75–80. (in Russian)
25. Darmov I.V., Chicherin I.Yu., Erdyakova A.S., Lundovskikh I.A., Pogorelsky I.P. The method for modeling intestinal dysbacteriosis in laboratory animals. Patent RF, no. 2477894, 2014. (in Russian)
26. Bredikhin, V.N., Pozdnjakov, I.V., Chicherin, I.Yu., Pogorelsky, I.P., Lundovskikh, I.A., Leshchenko, A.A., Lazykin, A.G. (2013). Microecological changes in the intestine during dysbacteriosis: experimental substantiation the possibility of correction dysbiotic changes with prebiotic stimbid. *Health of the population and habitat*, 12(249), 19–21. (in Russian)
27. Pogorelsky, I.P., Chicherin, I.Yu., Darmov, I.V., Lundovskikh, I.A., Gavrilov, K.E. (2012). Probiotics: the vector of development. *Practical medicine*, 3(58), 180–188. (in Russian)
28. Chicherin I.Yu., Pogorelsky I.P., Lundovskikh I.A., Yanov, S.N. The method for assessment of the exposure of the intestinal microflora to exogenic factors in its dysbiotic disorders. Patent RF, no.2483113, 2013. (in Russian)
29. Chicherin, I.Yu., Darmov, I.V., Pogorelsky, I.P., Lundovskikh, I.A., Gavrilov, K.E. (2012). The survival of bifid bacteria and lactic bacteria in the conditions in vitro in gastric juice and duodenal contents of people. *Medical Almanac*, 1, 57–59. (in Russian)
30. Darmov, I.V., Chicherin, I.Yu., Pogorelsky, I.P., Lundovskikh, I.A. (2011). Survival of probiotic microorganisms in in vitro conditions simulating the digestive process in humans. *Experimental and clinical gastroenterology*, 3, 6–11. (in Russian)
31. Pogorelsky, I.P., Darmov, I.V., Chicherin, I.Yu., Erdyakova A.S., Lundovskikh, I.A. (2011). Comparative assessment of survival of probiotic microorganisms from commercial preparations under the conditions in vitro. *Experimental and clinical gastroenterology*, 9, 96–101. (in Russian)
32. Chicherin, I.Yu., Darmov, I.V., Lundovskikh, I.A., Pogorelsky, I.P., Leschenko, A.A., Kulikova L.E. (2014). Do commercial probiotics need microbial cells? *Journal of International Medicine*, 1(6), 12–18. (in Russian)
33. Shenderov, B.A. (2013). Metabiotics: novel idea or natural development of probiotic conception. *Microbiol Ecology in Health & Disease*. [Electronic resource: [http:// dx.doi.org/ 10.3402/mehd.v240i0.20399](http://dx.doi.org/10.3402/mehd.v240i0.20399). Access date 02.11. 2017]
34. Pogorelsky, I.P., Chicherin, I.Yu., Lundovskikh, I.A. (2013). Ecological and functional marginality of probiotic microorganisms. [Electronic resource: <http://gastroportal.ru/files/mikroflora.pdf>. Access date 06.11.2017] (in Russian)
35. Lidbeck, A., Gustafson, I.A., Nard, C.E. (1987). Impact of Lactobacillus acidophilus supplement on the human oropharyngeal and intestinal microflora. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 19(5), 531–537.
36. Vorob'ev, A.A., Nesvizhskiy, Yu.V., Budanova E.V., Inozemtseva L.O. (1995). Population genetic aspects of microbiological phenotype of healthy human intestine. *Journal of Microbiology*, 4, 30–35. (in Russian)
37. Ardatskaya, M.D., Minushkin, O.N. (2006). Modern principles of diagnostics and pharmacological correction. *Gastroenterology. Supplement to the Journal "Consilium Medicum"*, 8, 1–25. (in Russian)
38. Erdyakova A.S., Chicherin, I.Yu., Lundovskikh, I.A., Pogorelsky, I.P. (2012). Experimental assessment of the lymphocytotoxic action of bifidobacteria and lactobacteria. *Practical Medicine*, 3(58), 194–196. (in Russian)
39. Chicherin, I.Yu., Darmov, I.V., Bogacheva N.V., Pogorelsky, I.P., Lundovskikh, I.A., Shevtsov A.N. (2013). Study on the effect of high doses of probiotic Bifidumbacterin and microorganisms of the intestinal auto-flora on the body of white mice and the indicators of cellular immunity. *Medical Council of the Volga Region*, 1(6): 85–90. (in Russian)
40. Maksimov, I.K. (2004). Microbiocenosis disorder on the background of polychemotherapy in patients with oncological diseases of the blood system: new models of diagnostics and correction. *Pharmateca*, 13, 79–84. (in Russian)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Принадлежность к организации

Чичерин Игорь Юрьевич — кандидат медицинских наук, президент, Научное общество «Микробиота». 141323, Московская обл., Сергиево-Посадский р-он, пос. Лоза, д. 9-Д
Тел.: +7-496-547-53-00
E-mail: rpatron@mail.ru

Погорельский Иван Петрович — доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры Микробиологии Института биологии биотехнологии, Вятский государственный университет. 610000, Россия, г. Киров, ул. Московская, д. 36.
Тел.: +7-8332-74-24-40
E-mail: ipogorelsky@inbox.ru

Лундовских Ирина Александровна — кандидат химических наук, доцент, доцент кафедры Микробиологии Института биологии и биотехнологии, Вятский государственный университет. 610000, Россия, г. Киров, ул. Московская, д. 36.
Тел.: +7-8332-74-24-40
E-mail: lundovskih@vyatsu.ru

Дармов Илья Владимирович — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой Микробиологии Института биологии и биотехнологии, Вятский государственный университет. 610000, Россия, г. Киров, ул. Московская, д. 36.
Тел.: +7-8332-74-24-40
E-mail: darmov@vyatsu.ru

Шабалина Марина Робертовна — кандидат педагогических наук, доцент кафедры фундаментальной и прикладной математики Института математики и информационных систем, Вятский государственный университет. 610000, Россия, г. Киров, ул. Московская, д. 36.
Тел.: +7-8332-74-25-15
E-mail: usr01589@vyatsu.ru

Критерии авторства

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.11.2017

AUTHOR INFORMATION

Affiliation

Igor Yu. Chicherin — candidate of medical sciences President, Scientific society «Microbiota». pos. Loza, 9-D, Sergiev Posadsky district, Moscow region., Russia, 141323
Tel.: +7-496-547-53-00
E-mail: rpatron@mail.ru

Ivan P. Pogorelsky — doctor of medical sciences, professor, professor of the Department of Microbiology, Institute of Biology and Biotechnology, Vyatka State University. Moskovskaya st., 36, Kirov, Russia, 610000
Tel.: +7-8332-74-24-40
E-mail: ipogorelsky@inbox.ru

Irina A. Lundovskikh — candidate of chemical sciences, docent, docent of the Department of Microbiology, Institute of Biology and Biotechnology, Vyatka State University. Moskovskaya st., 36, Kirov, Russia, 610000
Tel.: +7-8332-74-24-40
E-mail: lundovskih@vyatsu.ru

Ilya V. Darmov — doctor of medical sciences, Professor, Head of the Department of Microbiology, Institute of Biology and Biotechnology, Vyatka State University. Moskovskaya st., 36, Kirov, Russia, 610000
Tel.: +7-8332-74-24-40
E-mail: darmov@vyatsu.ru

Marina R. Shabalina — candidate of pedagogical sciences, docent, docent of the Department of Fundamental and applied Mathematics, Institute of Mathematics and Information Systems, Vyatka State University. Moskovskaya st., 36, Kirov, Russia, 610000
Tel.: +7-8332-74-25-15
E-mail: usr01589@vyatsu.ru

Contribution

The authors equally contributed to the writing of the manuscript and are equally responsible for plagiarism.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Received 15.11.2017

ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТНОГО РАСТВОРА ИЗ ГОВЯЖЬЕГО ЦЕЛЬНОГО СЫЧУГА ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ СВОЙСТВ КОЛЛАГЕНСОДЕРЖАЩЕГО РУБЦА

Баженова Б.А.*, Данилов А.М.

Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления, Улан-Удэ, Россия

Ключевые слова: рубец, сычуг, пепсин, модификация, индекс фрагментации, функционально-технологические показатели.

Аннотация

В настоящее время накоплен значительный опыт эффективной переработки вторичных сырьевых ресурсов мясной промышленности. Однако доля использования их на пищевые цели остается низкой. Это, прежде всего, касается переработки многокамерных желудков сельскохозяйственных животных. Перспективным направлением научных исследований является комплексное использование как пищевого, так и биотехнологического потенциала этих субпродуктов. В данной работе исследована возможность ферментативной модификации коллагенсодержащего рубца крупного рогатого скота раствором пепсина (лизатом). Раствор пепсина получен методом автолиза из ферментсодержащей камеры желудка крупного рогатого скота — цельного сычуга, тогда как обычно лизат получают из слизистой оболочки сычуга, процесс отделения которого является достаточно трудоемким. Исследованиями установлено, что лизат, приготовленный на основе цельных говяжьих сычугов, наряду с протеолитической, обладает и коллагеназной активностью. Для повышения эффективности выделения пепсиногена жесткую соединительную ткань сычуга измельчали и разрыхляли кислым раствором полифосфата, который обладает также бактериостатическим действием. На основании результатов эксперимента разработана рациональная технология выделения пепсина из цельных сычугов без предварительного отделения слизистой оболочки. Также доказана возможность ферментативной модификации коллагенсодержащего говяжьего рубца полученным лизатом с улучшением функционально-технологических характеристик. Экспериментально установлены режимы и параметры процесса ферментативной модификации свойств ткани рубца.

Original scientific paper

PREPARATION OF THE ENZYME SOLUTION FROM THE WHOLE BOVINE ABOMASUM FOR MODIFICATION OF PROPERTIES OF THE COLLAGEN CONTAINING RUMEN

Bayana A. Bazhenova*, Andrey M. Danilov

East-Siberian State University of Technology and Management, Ulan-Ude, Russia

Key words: rumen, abomasum, pepsin, modification, index fragmentation, functional and technological indicators.

Abstract

At present, a significant experience in the effective processing of secondary raw material resources of the meat industry has been accumulated. However, a proportion of their use for food purposes remains to be low. First of all, this concerns processing of the multi-chambered stomach of farm animals. A prospective direction of scientific research is the complex use both of food and biotechnological potential of these by-products. In this work, a possibility of the enzymatic modification of the collagen-containing bovine rumen with the pepsin solution (lysate) was studied. The pepsin solution was obtained by the autolysis method from the enzyme containing chamber of the cattle stomach — the whole abomasum; whereas, usually the lysate is obtained from the abomasal mucosa, which separation is quite a labor consuming process. The investigations established that the lysate prepared on the basis of the whole bovine abomasa had the proteolytic activity along with the collagenase one. To increase the effectiveness of pepsinogen extraction, the tough connective tissue of abomasa was minced and loosened with the acidic solution of polyphosphate, which also has the bacteriostatic activity. Based on the results of the experiment, the rational technology of pepsin extraction from the whole abomasa without preliminary separation of the mucosa was developed. In addition, a possibility of the enzymatic modification of the collagen containing bovine rumen using the obtained lysate with improvement of the functional and technological characteristics was proved. The regimes and parameters of the process of the enzymatic modification of the rumen tissue properties were experimentally established.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Баженова Б.А., Данилов А.М. Получение ферментного раствора из говяжьего цельного сычуга для модификации свойств коллагенсодержащего рубца. Теория и практика переработки мяса. 2017;2(4):62-75. DOI:10.21323/2414-438X-2017-2-4-62-75

FOR CITATION: Bayana A. Bazhenova, Andrey M. Danilov. Preparation of the enzyme solution from the whole bovine abomasum for modification of properties of the collagen containing rumen. Theory and practice of meat processing. 2017;2(4):62-75. (In Russ.) DOI:10.21323/2414-438X-2017-2-4-62-75

Введение

Одним из интенсивно развивающихся и перспективных направлений мясоперерабатывающей отрасли промышленности является разработка новых рецептур и технологий с использованием вторичного мясного сырья, содержащего достаточное количество белков, жиров, витаминов и микроэлементов. Вовлечение в производство вторичного сырья мясной промышленности способствует повышению эффективности использования белоксодержащего сырья, расширению ассортимента продуктов питания и решению экологических задач.

В последние годы особое внимание уделяют использованию субпродуктов на пищевые цели. Это связано, прежде всего, с достаточно высоким выходом вторичного белоксодержащего сырья по отношению к живой массе скота. Например, рубец имеет выход 1,7–2,5%, это составляет примерно 6–8 кг от одного животного. Следует также отметить, что в СССР на мясокомбинатах стабильно работали убойные цеха. Субпродукты направляли на изготовление пищевой и технической продукции, корма, использовали как эндокринно-ферментное сырье. Сегодня эти производства практически отсутствуют на мясоперерабатывающих предприятиях. Кроме того, переработка субпродуктов процесс трудоемкий, требует значительных ресурсных затрат. Эти вопросы невозможно решить на мелких предприятиях и убойных пунктах.

Научные исследования в этой области посвящены максимальному использованию как пищевого, так и биотехнологического потенциала субпродуктов. Исследователи предлагают такие направления использования коллагенсодержащего сырья, как получение белково-жировых эмульсий [1, 2, 3], желатина [4], препаратов для зоотехнии [5], включение модифицированных субпродуктов в рецептуру мясных изделий [6, 7, 8].

Некоторые субпродукты, такие как желудок сельскохозяйственных животных, эндокринные органы и другие, обладают биотехнологическим потенциалом. Желудок жвачных животных представляет собой две пищеварительные полости, которые существенно различаются друг от друга по строению и функциям: фундальную и пилорическую. Примечательно, что пепсин пилорического сока переваривает соединительнотканые белки [9].

Отдельной камерой желудка крупного рогатого скота является сычуг, слизистая оболочка которого, являющаяся ценным эндокринно-ферментным сырьем для получения фермента пепсина, широко используется в сыроделии и практической медицине для создания препаратов, стабилизирующих процессы пищеварения. Анализ имеющихся в литературе исследований в этом направлении показал возможность использования известного тендеризирующего эффекта протеолитических ферментов, имеющихся в слизистой оболочке сычуга крупного рогатого скота.

Однако сложным технологическим процессом является отделение слизистой оболочки от ткани сычуга. Поэтому в данной работе рассмотрена возможность выделения и активизации пепсиногена из цельных сычугов и исследование его тендеризирующего действия на коллагенсодержащий рубец, который имеет наибольший выход 1,7–2,5%. Преобладающим функциональным составным компонентом которого является соединительная ткань, состоящая из коллагена и эластина, с включениями жировой и мышечной тканей. Гладкая мышечная ткань рубца состоит из внутреннего и наружного слоев. К гладкой мышечной ткани рубца примешиваются и поперечно-полосатые мышечные волокна [1].

Коллагеновые и эластиновые волокна рубца придают ему высокую прочность, что требует применения способов его тендеризации для дальнейшего использования в рецептуре мясopодуктов. Существуют механические, физические, химические и биотехнологические способы тендеризации коллагенсодержащего сырья. Наиболее эффективным из перечисленных методов является биотехнологический, однако применение готовых ферментных препаратов в мясной промышленности ограничено, что объясняется дороговизной препаратов, трудностью подбора ферментов, воздействующих на белки и структурные элементы мышечной и соединительной тканей мяса в желаемом направлении.

Воздействовать на белки коллагенсодержащего сырья могут протеазы и коллагеназы. Известно, что коллагеназы не обладают строгой субстратной специфичностью. Так, коллагеназа микробного происхождения, синтезируемая *Clostridium histolyticum*, обладает широкой специфичностью и может расщеплять полипептидную цепь по более чем 200 участкам [10].

Тканевые коллагеназы проявляют более узкую специфичность. Например, коллагеназа головастика расщепляет тропоколлаген в одном лишь месте, причем сразу все три цепи. В результате при температуре 37 °C два фрагмента спонтанно разворачиваются и становятся доступными действию других протеолитических ферментов [10].

Пепсиноген пилорического сока сычуга после активизации может обладать и протеолитической, и коллагеназной активностью, переваривая соединительнотканые белки [9].

В связи с этим для решения задачи эффективной переработки субпродуктов на пищевые цели проведены исследования по улучшению технологических свойств говяжьего рубца, который, в основном, состоит из соединительной ткани и после тепловой обработки приобретает жесткую структуру.

Исходя из вышесказанного целью работы явилось исследование возможности получения ферментного раствора из говяжьего цельного сычуга для модификации функционально-технологических свойств коллагенсодержащего рубца.

Материалы и методы

Для проведения эксперимента заготовку сырья осуществляли на Петропавловском мясокомбинате (Джидинский район, Республика Бурятия). В соответствии с принятой технологией в процессе убоя животного извлекли внутренние органы, в том числе желудочно-кишечный тракт, который направили на специальный стол. На столе произвели отделение кишечника и разделение многокамерного желудка на отдельные части: книжку, сетку, рубец и сычуг. Следует отметить, что сычуг отделяли вместе с начальным отделом кишечника, который, также как и сычуг, в кислой среде выделяет пепсин, гидролизующий мышечные и соединительные белки. Разделенные камеры желудка освобождали от содержимого и жировой ткани, промывали водой температурой не выше 25 °С, замораживали в специальных емкостях при температуре минус 18 °С, хранили не более шести месяцев при температуре минус 12 °С. Замороженные субпродукты были направлены на проведение экспериментальных исследований в лабораторию кафедры «Технология мясных и консервированных продуктов» Восточно-Сибирского государственного университета технологий и управления (г. Улан-Удэ, РФ).

Для достижения поставленной цели на первом этапе были проведены эксперименты по приготовлению раствора пепсина (лизата) из цельного сычуга. За основу была принята технология выделения пепсина из слизистой оболочки, полученной путем трудоемкого процесса отделения ее от ткани сычуга [11].

В отличие от принятой технологии был использован цельный сычуг, скорректированы дозы воды и соляной кислоты. Количество добавляемой соляной кислоты, необходимой для активизации пепсина, регулировали с учетом величины кислотности реакционной смеси, которая должна составлять 2,0.

Таким образом, технология получения раствора пепсина заключалась в следующем: один килограмм чисто измельченной ткани сычуга выдерживали в реакционной смеси, состоящей из 2,5 л воды, 0,026 л концентрированной кислоты плотностью 1,19 г/см³ при температуре 30 °С. Затем смесь фильтровали через четырехслойный марлевый фильтр. В полученном растворе фермента пепсина (лизат), определяли протеолитическую и коллагеназную активность. В ходе эксперимента были уточнены продолжительность настаивания и пути повышения эффективности выделения пепсиногена.

Протеолитическую активность лизата изучали с использованием в качестве субстрата гемоглобина [12]. Коллагеназную активность раствора пепсина исследовали с использованием биуретового реактива и коллагена [13]. Опытную и контрольную пробы колориметрировали с зеленым светофильтром против второй контрольной на КФК-3-01 («Швабе», Россия). О коллагеназной активности лизата судили по величине экстинкции (Е). Для перевода ее в проценты рас-

творенного белка использовали стандартные данные, представленные в Табл. 1.

Табл. 1. Зависимость величины экстинкции от степени расщепления коллагена

Показатели	Значение				
Величина экстинкции, Е	0,174	0,116	0,088	0,061	0,029
Растворенный коллаген, %	54,5	36,0	27,8	23,7	11,6

На следующем этапе была исследована возможность тендеризации коллагенсодержащего рубца лизатом. Для этого рубец измельчали через волчок с диаметром решетки 3–5 мм подвергали ферментации путем введения 20 % полученного раствора лизата.

В ходе второго этапа эксперимента были определены органолептические показатели (в т.ч. степень разжевываемости) — по пятибальной шкале, массовые доли белка методом Кьельдаля, липидов — методом Сокслета, влаги — высушиванием, золы — озолением, функционально-технологические свойства — влагоудерживающая (ВУС) и жирудерживающая способности (ЖУС) — по методу ВНИИМП [14]. Также был изучен показатель «индекс фрагментации», который определяли путем фильтрации ферментированного образца, сбора и высушивания осадка и определения его массы [15].

Эксперименты проведены в трехкратной повторности.

Результаты и обсуждение

Для изучения возможности получения ферментного раствора из цельных сычугов были выработаны растворы пепсина из слизистой оболочки сычуга (контроль) и ткани сычуга (опыт) и исследованы их протеолитическая и коллагеназная активности, представленные на Рис. 1 и 2.

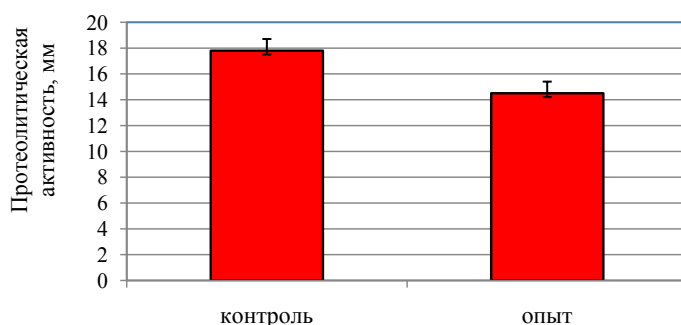


Рис. 1. Протеолитическая активность растворов пепсина, полученных из слизистой (контроль) и сычуга (опыт)

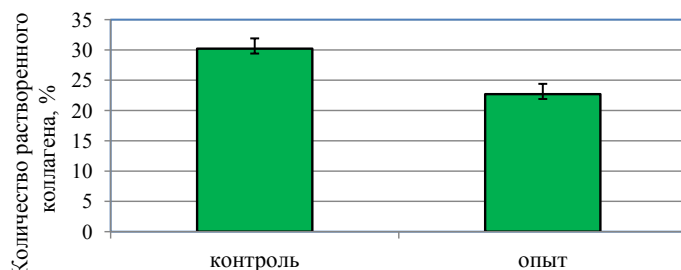


Рис. 2. Показатель коллагеназной активности растворов пепсина, полученных из слизистой (контроль) и сычуга (опыт)

Как показывают данные Рис. 1 и 2, протеолитическая активность опытного образца раствора пепсина статистически достоверно снижалась (на 18,5 %) по сравнению с контролем, также снижалась коллагеназная активность (на 24,8 %), что свидетельствует о меньшей степени ферментативного воздействия опытного раствора, вероятно, в связи с более низкой степенью извлечения пепсиногена из ткани сычуга.

С целью повышения эффективности выделения пепсиногена в качестве разрыхлителя слизистой и стенок сычуга решено было использовать триполифосфат натрия, который традиционно используют в количестве 0,5–1,5 % к массе основного сырья при производстве мясных изделий.

В связи с тем, что лизат планируется использовать для обработки рубцовой ткани, которая затем будет включаться в рецептуру мясных фаршевых изделий, доза триполифосфата натрия для обработки сычугов рассчитана и выбрана 1,0, 1,5, 2,0 %. Компонент предварительно смешивали с водой и вводили в раствор, предназначенный для обработки сычугов. В полученном растворе фермента была исследована протеолитическая активность при введении разных доз триполифосфата натрия. Данные представлены на Рис. 3.

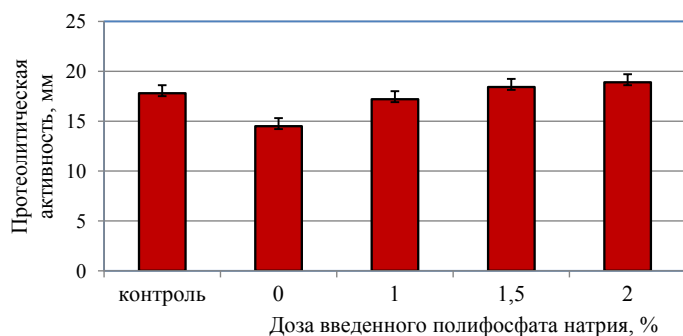


Рис. 3. Протеолитическая активность растворов пепсина, полученных с использованием разных доз триполифосфата натрия

Данные Рис. 3 свидетельствуют о том, что добавление полифосфата повышает протеолитическую активность полученного раствора. Так, введение 1 % триполифосфата натрия способствует повышению протеолитической активности на 18,6 %, однако ее уровень остается ниже контрольного значения. Отмечено, что введение 1,5 и 2,0 % фосфатного препарата повышает протеолитическую активность, примерно до одинакового уровня 18,4–18,9 мм, что выше контрольного значения в среднем на 4–6 %.

Далее исследовали коллагеназную активность, представленную на Рис. 4.

Полученные данные рисунка 4 свидетельствуют о том, что введение полифосфата способствует повышению и коллагеназной активности опытных образцов лизата. Введение триполифосфата натрия в количестве 1,5 % повышает коллагеназную активность раствора пепсина до уровня 29,92 %, что равно значению исследуемого показателя контрольного образца,

равному 30,20 %. Дальнейшее увеличение дозы полифосфата до 2,0 % не меняет значение коллагеназной активности раствора. Вероятно, добавление полифосфата натрия способствует разрушению связей между полипептидными цепочками, разволокнению структуры ткани сычуга, что облегчает процесс высвобождения молекул пепсиногена.

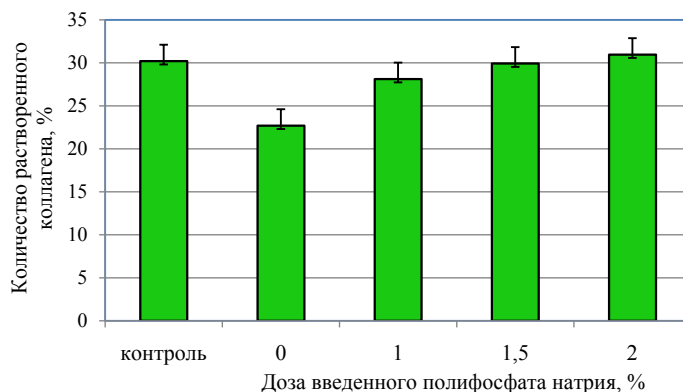


Рис. 4. Показатель коллагеназной активности растворов пепсина, полученных с использованием разных доз триполифосфата натрия

Исходя из полученных данных принята доза вводимого триполифосфата натрия — 1,5 %, обеспечивающая высокую степень извлечения пепсиногена из ткани цельного сычуга.

Далее был проведен эксперимент по уточнению продолжительности процесса выдержки субстрата в реакционной смеси. Типовая технологическая инструкция по производству раствора пепсина из слизистой оболочки сычуга рекомендует трехкратное настаивание: сначала выдержка в течение 4 ч, затем осадок заново смешивается с кислым раствором и выдерживается в течение 2 ч, далее процесс повторяется и раствор выдерживается еще 2 ч. На Рис. 5 представлено значение протеолитической активности раствора пепсина, полученного из цельного сычуга путем трехкратного настаивания (4 ч, 2 ч, 2 ч) и путем непрерывного настаивания (8 ч).

Представленные данные выявили, что непрерывная выдержка субстрата не приводит к изменению активности общего количества лизата (разница входит в статистическую ошибку), зато снижает трудоемкость и длительность процесса. В связи с этим принята продолжительность настаивания измельченной ткани сычуга в кислом растворе — 8 часов.

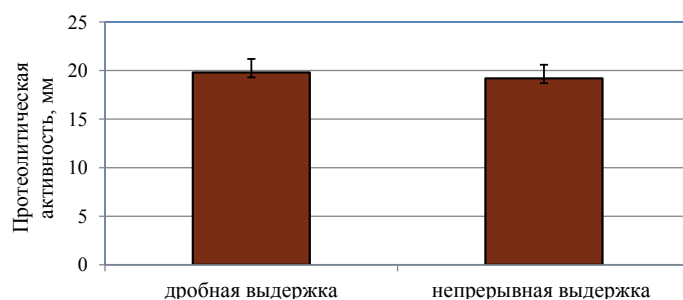


Рис. 5. Протеолитическая активность растворов пепсина, полученных дробной и непрерывной выдержкой сычуга в реакционной смеси

На основе экспериментов разработана технологическая схема получения лизата из цельных говяжьих сычугов, представленная на Рис. 6.

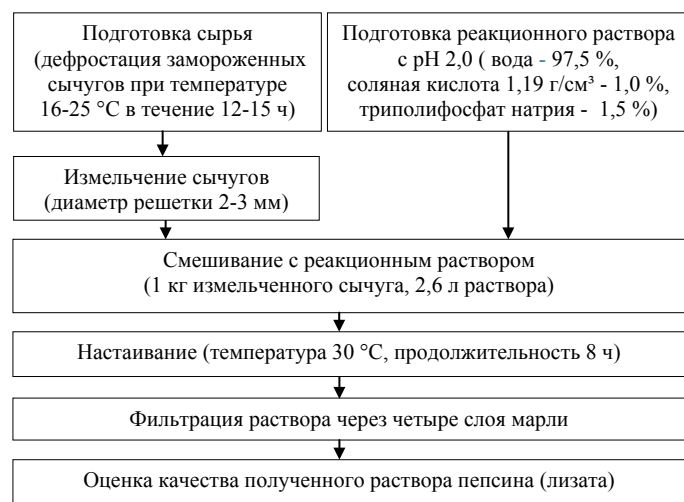


Рис. 6. Технологическая схема получения раствора пепсина из цельных говяжьих сычугов

Лизат, полученный в соответствии с предложенной технологической схемой был оценен по качественным показателям, результаты исследования которых представлены в Табл. 2.

Табл. 2. Качественные показатели раствора пепсина, полученного из цельных говяжьих сычугов

Показатели	Значение	
	контроль	опыт
Цвет	Светло-бежевый	Бежевый
Консистенция	Слизистая	Слизистая
Запах	Специфический	Специфический
Протеолитическая активность, мм	17,8	18,4
Коллагеназная активность (количество растворенного коллагена, %)	30,2	29,8

Данные, представленные в Табл. 2 показали, что раствор пепсина, выделенный из цельного сычуга, имеет органолептические показатели схожие с лизатом, полученным из слизистой оболочки и обладает высокой ферментативной активностью.

На следующем этапе были проведены исследования возможности тендеризации коллагенсодержащего говяжьего рубца полученным раствором лизата. Вначале были исследованы химический состав и технологические свойства говяжьего рубца, представленные в Табл. 3.

Данные, представленные в Табл. 3 свидетельствуют о том, что в состав рубца входят вода, белки, жиры и минеральные вещества. Отмечено, что по количеству белков рубец близок к мышечной ткани, однако имеет очень высокое содержание коллагена — почти 65 %, например, в мясе его содержание составляет лишь 15–20 %.

Табл. 3. Химический состав и свойства говяжьего рубца

Показатели	Единица измерения	Значение
Массовая доля влаги	%	75,2 ± 1,2
Массовая доля белка	%	15,0 ± 1,1
в т.ч. — коллагена	%	9,7 ± 0,6
— эластина	%	0,5 ± 0,1
Массовая доля жира	%	4,8 ± 0,6
Массовая доля золы	%	1,5 ± 0,1
Влагосвязывающая способность	%	55,6 ± 1,1
Усилие среза	*10 ² Па	6,7 ± 0,12
Выход	%	2,9 ± 0,2
Температура сваривания	°C	66,0 ± 2,1

Результаты исследования технологических свойств указывают на низкую влагосвязывающую способность рубца 55,6 % и высокое значение усилия среза, так как коллагеновые и эластиновые волокна имеют высокие прочностные характеристики, которые придают жесткость рубцовой ткани.

Температура сваривания является важным показателем коллагена, характеризующим его структурные изменения — в рубце она имеет высокое значение около 66 °C. Известно, что при этой температуре пучки волокон коллагена сильно сжимаются, изгибаются и становятся более эластичными, в связи с этим было решено изучить процесс модификации ткани рубца в сыром виде и после термообработки.

Для изучения процесса модификации свойств рубца было исследовано влияние полученного раствора пепсина на показатель «индекс фрагментации» рубца сырого и после отваривания (при температуре 75–80 °C в течение 15–20 мин).

Подготовленный рубец измельчали через волчок с диаметром решетки 3–5 мм и подвергали ферментации при температуре 35–37 °C в течение 12 часов. Продолжительность выдержки в ферментном растворе была выбрана для сравнительного анализа — 12 часов, исходя из того, что пепсин гидролизует белки и пептиды гораздо медленнее, чем другие протеиназы [13], в исследованиях, представленных ниже, проведен эксперимент по обоснованию этой продолжительности.

Результаты исследования влияния раствора пепсина на индекс фрагментации сырой и вареной рубцовой ткани представлены на Рис. 7.

Анализ данных Рис. 7 показывает, что ткань рубца после тепловой обработки больше подвергается действию ферментов по сравнению с сырым рубцом, так как значение индекса фрагментации на всем протяжении эксперимента остается ниже, что свидетельствует о большей степени разрушения ткани субстрата. Так, при добавлении 10 % лизата индекс фрагментации в опыте 2 ниже уже на 12 % по сравнению с опытом 1, при увеличении дозы ферментного раствора до

20–40 % значение исследуемого показателя понижается на 21–23 %. Видимо, предварительная тепловая обработка рубца способствует свариванию коллагена и денатурации соединительнотканых и мышечных белков. Механизм термомодификации заключается в том, что при тепловом движении нарушается тройная спираль основной структурной единицы коллагена — тропоколлагена и образуется разорванная структура, имеющая конфигурацию статического клубка [13]. То есть после тепловой обработки тропоколлаген утрачивает спирализованность структуры и пептидные связи становятся доступными молекулам пепсина.

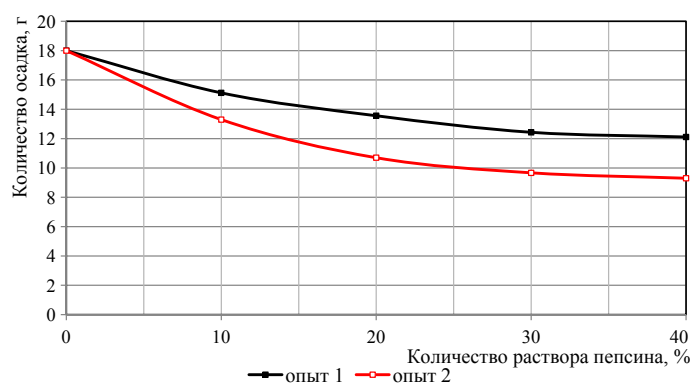


Рис. 7. Изменение индекса фрагментации сырой (опыт 1) и вареной (опыт 2) рубцовой ткани

Если рассматривать динамику индекса фрагментации в опыте 2 в зависимости от количества вводимого лизата, то можно отметить, что увеличение дозы вводимого лизата свыше 30 % не приводит к существенному изменению исследуемого показателя. В связи с этим оптимальной принята доза раствора пепсина для обработки вареного рубца — 30 %.

Далее провели исследование по обоснованию продолжительности выдержки вареного рубца в растворе пепсина, было изучено изменение индекса фрагментации вареного рубца при выдержке в ферментном растворе в течение 6, 8, 10, 12, 14, 16 часов. Данные представлены на Рис. 8.

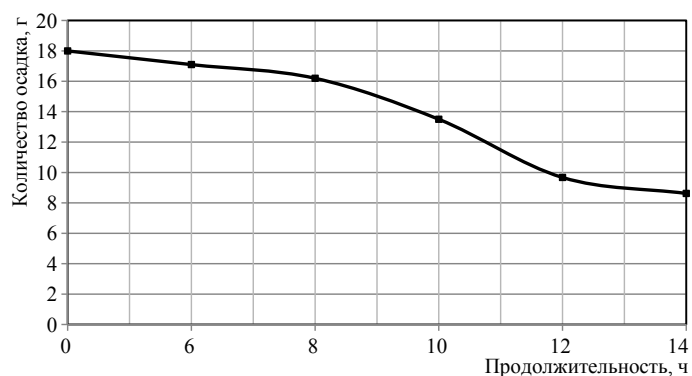


Рис. 8. Влияние продолжительности выдержки вареной рубцовой ткани в ферментном растворе на изменение индекса фрагментации

Как свидетельствуют данные, представленные на Рис. 8, только через 10 часов выдержки субстрата

в ферментном растворе наблюдается значительное снижение индекса ферментации на 25 %, через 12 часов — уже на 46,3 % далее значительного изменения значения исследуемого показателя не наблюдается. Таким образом, выбрана оптимальная продолжительность процесса ферментации — 12 часов. Хотелось бы отметить, что действие пепсина заключается в его способности разрушать водородные и дисульфидные связи между полипептидными цепями, что приводит к образованию «открытых» форм белковых молекул мясного сырья. В результате наблюдаются морфологические изменения мышечных, коллагеновых и эластиновых волокон и, как следствие, способствующие улучшению функционально-технологических свойств ткани (Рис. 9).

На Рис. 9 представлены результаты исследования таких функционально-технологических показателей, как водоудерживающая и жирудерживающая способности рубца после ферментирования (опыт) по сравнению с исходным измельченным рубцом без ферментации (контроль).

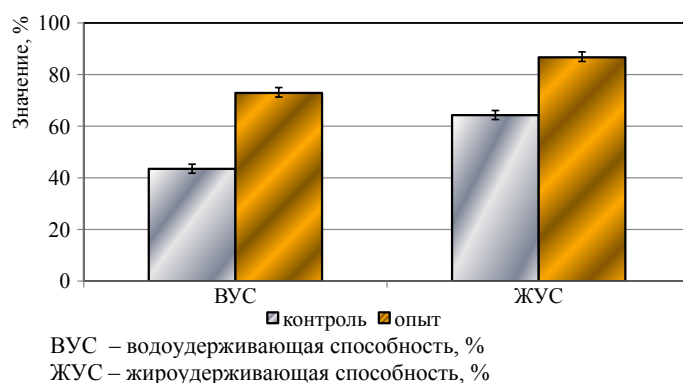


Рис. 9. Функционально-технологические показатели ферментированного рубца

Данные Рис. 9 показали, что после выдержки рубца в ферментном растворе наблюдается статистически достоверное улучшение функционально-технологических характеристик. Это подтверждает возможность модификации свойств ткани коллагенсодержащего рубца путем ее обработки лизатом из цельного говяжьего сычуга. Несомненно, что инициатором повышения функционально-технологических свойств рубца выступает изменение структуры коллагена, а также гладких и поперечнополосатых мышечных волокон, которое способствует появлению активных функциональных гидро- и липофильных групп.

На основании полученных результатов экспериментальных исследований разработана технологическая схема ферментации говяжьего рубца раствором пепсина, полученным из цельных сычуг (Рис. 10).

В соответствии с представленной технологической схемой после отбора рубцы подготавливают (обезжиривают, разрезают, промывают, шпарят и очищают от слизистой оболочки), затем варят, измельчают и подвергают ферментации при выдержке

субстрата: (ферментный раствор в соотношении 10:3 в течение 12 часов). Далее охлаждают, тонко измельчают и диспергируют до получения пасты, которую можно использовать в производстве измельченных мясных продуктов.

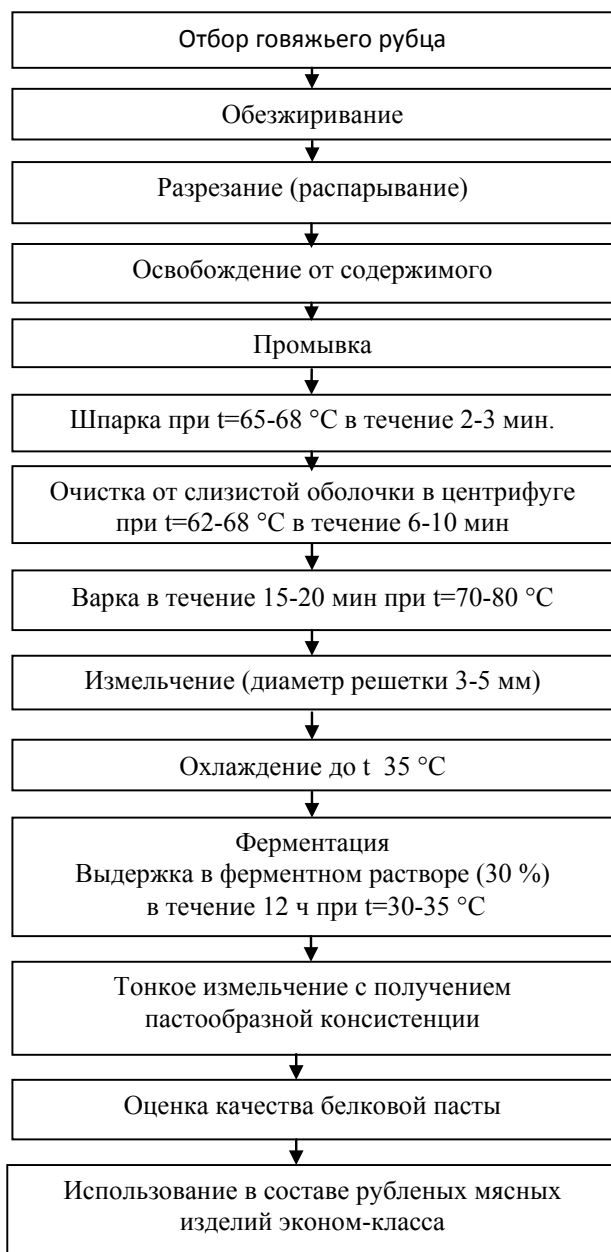


Рис. 10. Технологическая схема ферментации говяжьего рубца

Биотехнологический способ тендеризации коллагенсодержащих продуктов играет заметную роль среди предлагаемых способов размягчения жесткого сырья. Исследователи предлагают использовать протеолитические ферменты разного происхождения отдельно или в сочетании.

В работе [16] обоснована целесообразность применения протеолитических ферментов животного (коллагеназа из гепатопанкреаса камчатского краба)

и микробного (мегатерин Г10Х и протосубтилин Г10Х) происхождения для обработки низкосортного мясного сырья с высоким содержанием соединительнотканых белков.

Автором [17] показано, что при обработке говяжьими ферментным препаратом животного происхождения протепсин происходит набухание мышечных волокон и соединительной ткани, что приводит к повышению гидрофильности.

Установлено повышение гидрофильности и улучшение прочностных свойств мяса кур яйценоской породы после ферментной обработки коллагеназой и трипсином [18].

Выявлено, что применение трансглутаминазы при производстве мясных продуктов повышает гидрофильность мышечных белков из-за способности переносить активные группы от одного соединения к другому [19].

Изучено влияние пропионовокислых бактерий [20] и совместно бифидобактерий, пропионовокислых бактерий, а также пепсина и трипсина [21] на свойства мясного сырья, установлено улучшение структуры изучаемых тканей.

Недостатками биотехнологического способа обработки мышечной и соединительной тканей является дороговизна препаратов, а также избирательность действия ферментов. Предлагаемый нами способ тендеризации коллагенсодержащего сырья позволяет выделить ферментный раствор, имеющий высокие протеолитическую и коллагеназную активности, из побочного животного сырья, который можно использовать для размягчения малоценного белоксодержащего сырья с целью рационального его использования.

Выводы

На основании проведенных исследований предложен способ получения раствора пепсина из цельного говяжьего сычуга путем настаивания измельченного сычуга в реакционной смеси, содержащей соляную кислоту, триполифосфат натрия и воду с последующим фильтрованием. Воздействуя полученным ферментным раствором на термически обработанную ткань коллагенсодержащего рубца, выявлена возможность улучшения ее функционально-технологических характеристик. Паста на основе модифицированного рубца может быть использована в рецептуре рубленых и эмульгированных мясных продуктов, субпродуктовых изделий (паштетов, ливерных колбас) как источник пищевых волокон, а также перспективным направлением дальнейших исследований может служить изучение способов регулирования глубины протеолиза и коллагенолиза с целью получения биологически активных пептидов.

Introduction

One of the most intensively developing and promising directions of the meat processing branch of the industry is the development of new formulations and technologies using secondary meat raw materials, which contain sufficient amounts of proteins, fats, vitamins and microelements. Inclusion of the secondary raw materials of the meat industry in production facilitates an increase in the effectiveness of the use of protein containing raw materials, extension of a food assortment and achievement of ecological goals.

Recently, a special attention has been paid to the use of by-products for food purposes. It is necessary to note the high rumen yield (1.7–2.5 %), which is indicative of its possible weight of 6–8 kg per animal. Secondly, it is necessary to note, that, previously, slaughter floors stably operated in meat processing enterprises, and by-products were sent for production of food and technical products, feeds and also used as endocrine-enzyme raw materials. Today, these productions are practically absent in meat processing enterprises. Moreover, processing of by-products is a labor consuming process, which requires significant resource expenditure. These questions cannot be solved in small enterprises and slaughter stations.

Scientific investigations in this field are devoted to the maximum use both of the food and biotechnological potential of by-products. Researchers propose several directions for the use of the collagen containing raw materials such as production of protein-fat emulsions [1, 2, 3], gelatin [4], preparations for zootechnics [5], incorporation of modified by-products into meat product formulations [6, 7, 8].

By-products such as the stomach of farm animals, endocrine organs and others have the biotechnological potential. The stomach of ruminants has two digesting cavities (fundal and pyloric), which are significantly different from each other by the structure and function. It is remarkable that pepsin of the pyloric juice digests connective tissue proteins [9].

An individual chamber of the bovine stomach is abomasum, which mucosa is a valuable endocrine-enzyme raw material for production of the enzyme pepsin and is widely used in cheese production and practical medicine to create preparations stabilizing digestive processes. Analysis of the available in the literature studies in this field shows a possibility to use the well-known tenderizing effect of the proteolytic enzymes existing in the bovine abomasal mucosa.

However, separation of the mucosa from the abomasum tissue per se is a difficult technological process. Therefore, this work examines the possibility to extract and activate pepsinogen from the whole abomasa and investigate their tenderizing action on the collagen containing rumen, which has the highest yield (for example, 1.7–2.5 % for cattle). The prevalent rumen functional component is the connective tissue, which consists of collagen and elastin with inclusion of the adipose and muscular tissues. The smooth-muscle tissue consists of the internal and external

layers. In addition to the smooth-muscle tissue, there are also the striated muscle fibers in the rumen [1].

The collagen and elastin fibers of the rumen give it high strength, which requires the application of methods for its tenderization for the further use in meat product formulations. There are mechanical, physical, chemical and biotechnological methods for tenderization of collagen containing raw materials. The most effective among the abovementioned methods are biotechnological; however, the use of the ready enzyme preparations in the meat industry is limited, which can be explained by expensiveness of the preparations, difficulties in selection of enzymes that affect proteins and structural elements of the meat muscular and connective tissues in a desired direction.

Proteins of the collagen containing raw materials can be affected by proteases and collagenases. It is known that collagenases do not have strong substrate specificity. For example, microbial collagenase synthesized by *Clostridium histolyticum* has broad specificity and can cleave the polypeptide chain at more than 200 sites [10].

Tissue collagenases have narrower specificity. For example, tadpole collagenase cleaves tropocollagen at a unique site across all three chains. As a result, two fragments spontaneously unfold at a temperature of 37 °C and become available to the action of other proteolytic enzymes [10].

After activation, pepsinogen of the pyloric juice of the abomasum can have both the proteolytic and collagenase activity digesting connective tissue proteins [9].

In this connection, to solve the task of effective processing of by-products for food purposes, the investigations were carried out regarding an improvement in the technological properties of the bovine rumen, which mainly consists of the connective tissue and acquires the tough structure after thermal treatment.

With regard to the above, the aim of this work was investigation of a possibility to produce an enzyme solution from the whole bovine abomasum for modification of the functional and technological properties of the collagen containing rumen.

Materials and methods

To carry out the experiment, the raw materials were obtained in the Petropavlovsk meat processing plant (Dzhindinsky district, The Republic of Buryatia).

According to the conventional technology, the internal organs (including the gastrointestinal tract) were removed in the process of animal slaughter and directed to the special table. On the table, the gut was separated and the multi-chambered stomach was divided into the individual parts: omasum, reticulum, rumen and abomasum. It is necessary to note, that the abomasum was separated with the first part of the gut, which similar to the abomasum, in the acidic environment, secretes pepsin, which hydrolyses muscular and connective tissue proteins. The separated stomach chambers were cleaned from their contents and adipose tissue, washed using water with a temperature of

not more than 25 °C, frozen in special containers at a temperature of –18 °C, and stored at a temperature of –12 °C for not more than six months. Frozen by-products were sent for experimental analysis to the laboratory of the Department of Meat and Canned Food Technology of the East-Siberian State University of Technology and Management, Ulan-Ude, Russia.

To achieve the set goal, at the first stage, the experiments on preparation of the pepsin solution (lysate) from the whole abomasum were carried out. The technology of extraction of pepsin from mucosa obtained by the labor consuming process of its separation from the abomasum per se [11] was taken as a basis.

In contrast to the conventional technology, the whole abomasum was used; the doses of water and hydrochloric

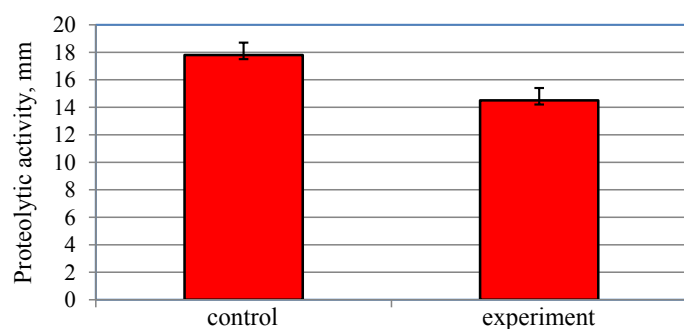


Fig. 1. The proteolytic activity of the pepsin solutions, obtained from the mucosa (control) and abomasum per se (experiment)

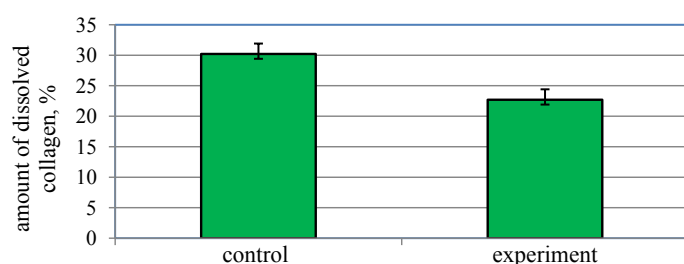


Fig. 2. The indicator of the collagenase activity of the pepsin solution obtained from mucosa (control) and abomasum per se (experiment)

acid were adjusted. An amount of added hydrochloric acid necessary for pepsin activation was regulated according to the acid value of the reaction mixture, which is to be 2.0.

Therefore, the technology of production of the pepsin solution was as follows. One kilogram of the pure abomasum was incubated in the reaction mixture, which consisted of 2.5 l of water, 0.026 l of concentrated acid with a density of 1.19 g/cm³ at a temperature of 30 °C. Then, the mixture was filtered through the four-layer gauze filter. The proteolytic and collagenase activity was determined in the obtained solution of pepsine (lysate). In the course of the experiment, duration of infusion and the ways of increasing the effectiveness of pepsinogen secretion were specified.

The proteolytic activity of the lysate was studied using hemoglobin as a substrate [12]. The collagenase activity of the pepsin solution was determined by the biuret reagent and collagen [13]. The colors of experimental and control samples were measured using the green light filter against the second control sample on KFK-3-01 (Shvabe, Russia).

The collagenase activity of lysate was judged by the extinction value (E). To transform it into the percentages of solubilized protein, the standard data presented in Table 1 were used.

Table 1. Dependence of the extinction value on the collagen cleavage degree

Indicators	Value				
Extinction value, E	0.174	0.116	0.088	0.061	0.029
Solubilized collagen,%	54.5	36.0	27.8	23.7	11.6

At the following stage, the possibility to use tenderization of the collagen containing rumen with the lysate was studied. To this end, the rumen was preliminarily minced through a grinder with a plate hole diameter of 3–5 mm and subjected to fermentation by introduction of 20 % of the obtained lysate solution.

During the second stage of the experiment, the organoleptic indicators were determined, including the degree of chewiness using the five-point scale, protein mass fraction by the Kjeldahl method, lipids by the Soxhlet method, moisture by drying, ash by combustion, functional and technological properties (moisture holding capacity (MHC) and fat holding capacity (FHC)) by the method of VNIIMP [14]. The fragmentation index was also studied, which was determined by filtration of the fermented sample, collection and drying of the sediment and measurement of its mass [15].

The experiments were carried out with three replications.

Results and discussion

To study the possibility of obtaining the enzyme solution from the whole abomasa, the pepsin solutions were made from the abomasal mucosa (control) and the abomasum per se (experiment); their proteolytic and collagenase activities were investigated (Fig. 1 and 2).

As the data in Fig 1 and 2 show, the proteolytic activity of the experimental sample of the pepsin solution statistically significantly decreased (by 18.5 %) compared to the control; the collagenase activity was also reduced (by 24.8 %), which points to the less degree of the enzymatic activity of the experimental sample, possibly, due to the lower degree of pepsinogen extraction from the abomasum tissue.

In order to increase the effectiveness of pepsinogen extraction, it was decided to use sodium tripolyphosphate, which is conventionally used in an amount of 0.5–1.5 % to the main raw material weight in meat product manufacture, as an agent for loosening of the abomasal mucosa and wells.

In connection with the fact that the lysate is planned to be used for treatment of the rumen tissue, which will be then included into formulations of minced meat products, the dose of sodium tripolyphosphate for abomasum processing was calculated and chosen at levels of 1.0, 1.5, 2.0 %. The component was preliminary mixed with water and added to the solution intended for abomasum processing. In the ob-

tained enzyme solution, the proteolytic activity upon introduction of different doses of sodium tripolyphosphate was investigated. The data are presented in Fig. 3.

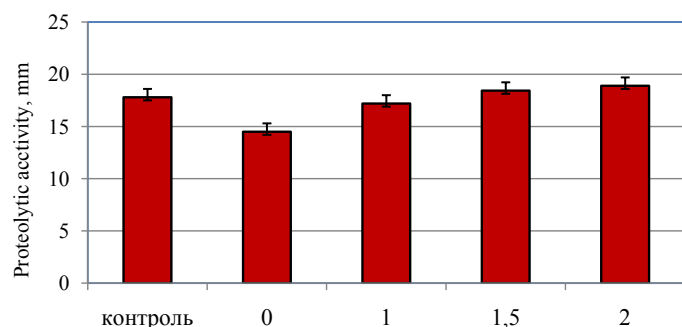


Fig. 3. The proteolytic activity of the pepsin solutions obtained with the use of different doses of sodium tripolyphosphate

The data in Fig.3 are indicative of the fact that an addition of tripolyphosphate increases the proteolytic activity of the obtained solution. For example, an addition of 1% of sodium tripolyphosphate facilitates an increase in the proteolytic activity by 18.6%; however, its level remains to be lower than the control value. It was observed that an addition of 1.5 and 2.0 % of phosphate preparation increases the proteolytic activity approximately to the same level of 18.4–18.9 mm, which is higher than the control value by 4–6 % on average. Then, the collagenase activity was studied, which is presented in Fig. 4.

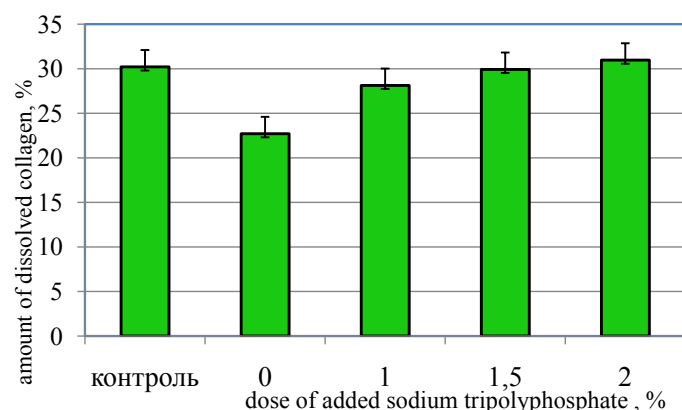


Fig. 4. The indicator of the collagenase activity of pepsin solutions obtained with the use of different doses of sodium tripolyphosphate

The obtained data in Fig. 4 show that an addition of polyphosphate also facilitates an increase in the collagenase activity of the experimental lysate samples. An addition of sodium tripolyphosphate in an amount of 1.5 % increases the collagenase activity of the pepsin solution up to the level of 29.92 %, which is equivalent to the value of the analyzed indicator in the control sample equal to 30.20 %. The following increase in the dose of sodium tripolyphosphate up to 2.0 % does not change the value of the collagen activity of the solution. It appears that an addition of sodium tripolyphosphate facilitates a breakage of the bonds between the polypeptide chains, separation of fibers in the structure of the abomasum, which assist the process of pepsinogen molecule release.

Based on the obtained data, the accepted dose of added sodium tripolyphosphate was 1.5 %, which ensured a high degree of pepsinogen extraction from the whole abomasum tissue.

After that, the experiment on specification of the process duration for the substrate incubation in the reaction mixture was carried out. The typical technological instruction on production of the pepsin solution from the abomasal mucosa recommends triple infusion: first, incubation for 4 hours; then, the sediment is mixed again with the acidic solution and incubated for 2 hours; after that, the process is repeated and the solution is incubated for additional 2 hours. Fig 5 presents the value of the proteolytic activity of the pepsin solution obtained from the whole abomasum by triple infusion (4 h, 2 h, 2 h) and by continuous infusion (8 h).

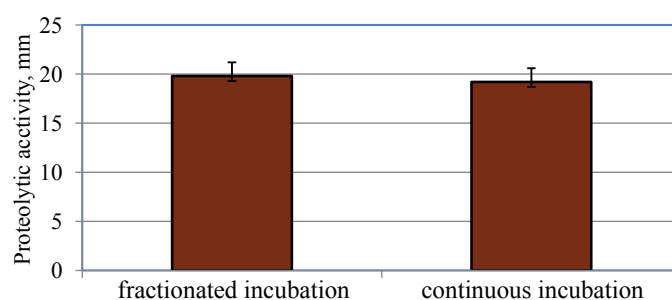


Fig. 5. The proteolytic activity of the pepsin solutions obtained by fractionated incubation and continuous incubation of the abomasum in the reaction mixture

The presented data revealed that continuous incubation of a substrate did not lead to changes in the activity of the total lysate quality (the difference was within the statistical error), but it decreased the labor intensity and duration of the process. In this connection, the duration of infusion of the mixed abomasum tissue in the acidic solution was 8 hours.

Based on the experiments, the technological scheme of lysate production from the whole bovine abomasa was developed (Fig. 6).

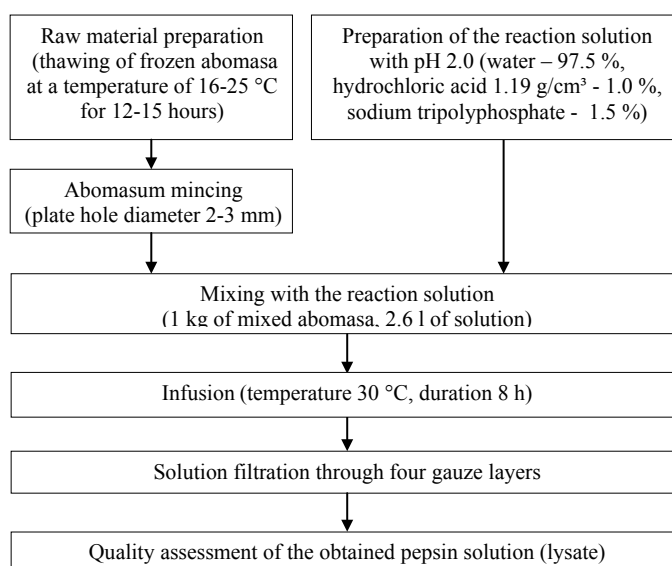


Fig. 6. Technological scheme of pepsin solution preparation from the whole bovine abomasa

Lysate prepared according to the proposed technological scheme was assessed by quality indicators; the results of their analysis are presented in Table 2.

Table 2. Quality indicators of the pepsin solution obtained from the whole abomasa

Indicators	Value	
	control	experiment
Color	light-beige	beige
Consistency	slimy	slimy
Odor	specific	specific
Proteolytic activity, mm	17.8	18.4
Collagenase activity (amount of dissolved collagen,%)	30.2	29.8

The data presented in Table 2 showed that the pepsin solution obtained from the whole abomasum had the organoleptic indicators similar to those of the lysate obtained from the mucosa and also had the high enzymatic activity.

At the next stage, a study on the possibility to tenderize the collagen containing bovine rumen with the obtained lysate solution was carried out. At first, the chemical composition and technological properties of the bovine rumen were investigated. The results are presented in Table 3.

Table 3. Chemical composition and properties of the bovine rumen

Indicators	Units of measurement	Value
Moisture mass fraction	%	75.2 ± 1.2
Protein mass fraction	%	15.0 ± 1.1
including — collagen	%	9.7 ± 0.6
— elastin	%	0.5 ± 0.1
Fat mass fraction	%	4.8 ± 0.6
Ash mass fraction	%	1.5 ± 0.1
Moisture binding capacity	%	55.6 ± 1.1
Shear force	*10 ² Pa	6.7 ± 0.12
Yield	%	2.9 ± 0.2
Cooking temperature	°C	66.0 ± 2.1

The data presented in Table 3 demonstrate that the rumen contains water, proteins, fats and minerals. It was noticed that by the protein amount, the rumen is closed to the muscle tissue; however, it has very high collagen content (almost 65 %), while in meat its content is only 15–20 %.

The results of the investigation of the technological properties point to the low moisture binding capacity of the rumen (55.6 %) and the high value of shear force as the collagen and elastin fibers have high strength characteristics, which impart toughness to the rumen tissue.

The cooking temperature is an important indicator of collagen, which characterizes its structural changes — in the rumen it has a value of about 66 °C. It is known that at that temperature the collagen fiber bundles are highly shrank, bent and become more elastic. In this connection

it was decided to study the process of rumen tissue modification in the raw form and after thermal treatment.

To study the process of rumen properties modification, an effect of the obtained pepsin solution on the indicator «fragmentation index» of the raw rumen and after its cooking (at a temperature of 75–80 °C for 15–20 min) was investigated.

The pre-prepared rumen was minced through a grinder with a plate hole diameter of 3–5 mm and subjected to fermentation at a temperature of 35–37 °C for 12 hours. The duration of incubation in the enzyme solution was chosen for the comparative analysis at a level of 12 hours based on the consideration that pepsin hydrolyses proteins and peptides significantly slower than other proteinases [13]; in the study presented below, the experiment on substantiation of this duration was carried out.

The results of the investigation of a protein solution effect on the fragmentation index of the raw and cooked rumen tissue are presented in Fig. 7.

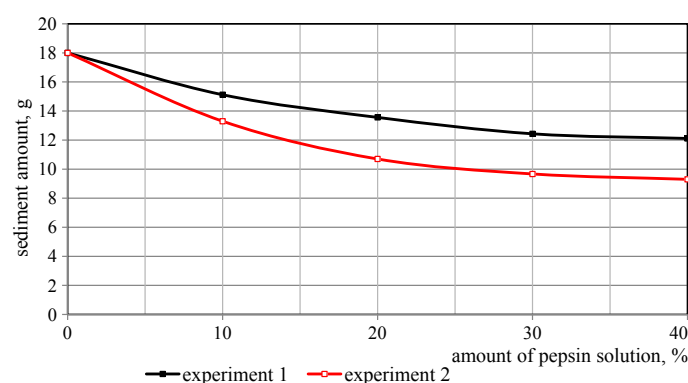


Fig. 7. Changes in the fragmentation index of the raw (experiment 1) and cooked (experiment 2) rumen tissue

Analysis of the data in Fig. 7 shows that the rumen tissue after thermal treatment is more subjected to the enzyme impact compared to the raw rumen as the value of the fragmentation index throughout the experiment remained to be lower, which is indicative of the higher degree of the substrate tissue destruction. For example, when adding 10 % of the lysate, the fragmentation index in the experiment 2 was 12 % lower compared to experiment 1; when increasing the dose of the enzyme solution up to 20–40 %, the value of the analyzed indicator decreased by 21–23 %. It appears that preliminarily thermal treatment of the rumen facilitates collagen cooking and denaturation of connective tissue and muscle proteins. The mechanism of thermal modification consists in the fact that upon thermal motion the triple helix of the main collagen structural unit, tropocollagen, is destructed and a broken structure of the static globular shape is formed [13]. That is, after thermal treatment, tropocollagen loses the helical shape of the structure and the peptide bonds become available to the pepsin molecules.

If we consider the dynamics of the fragmentation index in the experiment 2 depending on an amount of the added lysate, we can notice that an increase in the dose of the

added lysate over 30 % does not lead to a significant change in the indicator under investigation. In this connection, a dose of the pepsin solution for the cooked rumen processing was taken at a level of 30 %.

Then, a study on substantiation of the duration of cooked rumen incubation in the pepsin solution was carried out; changes in the fragmentation index of the cooked rumen were analyzed when incubating in the enzyme solution for 6, 8, 10, 12, 14, 16 hours. The data are presented in Fig. 8.

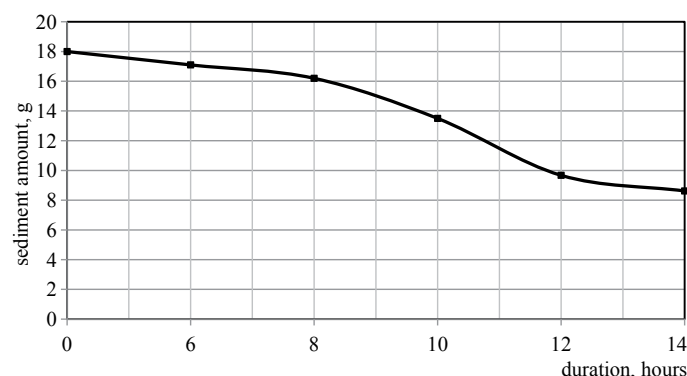
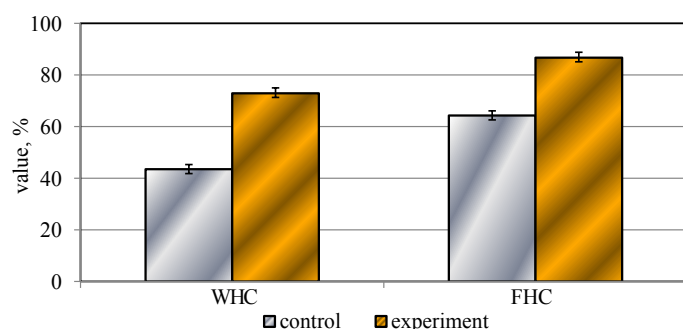


Fig. 8. An effect of duration of cooked rumen tissue incubation in the enzyme solution on changes in the fragmentation index

As the data presented in Fig. 8 demonstrate, only after 10 hours of incubation of the substrate in the enzyme preparation, a significant decrease (by 25 %) in the fragmentation index is evident; after 12 hours it decreases by 46,3 %, then, significant changes in the analyzed indicator is not observed. Therefore, an optimal duration (12 hours) of the fermentation process was chosen. It is necessary to note that an effect of pepsin consists in its ability to break the hydrogen and disulfide bonds between polypeptide chains, which leads to the development of «open» forms of protein molecules of meat raw materials. As a result, morphological changes in muscle, collagen and elastin fibers are observed, which, as a consequence, facilitate an improvement in the functional and technological properties of the tissue (Fig 9).



WHC – water holding capacity, %

FHC – fat holding capacity, %

Fig. 9. The functional and technological indicators of the fermented rumen

Fig. 9 presents the results of the investigation of the functional and technological indicators such as water holding capacity (WHC) and fat holding capacity (FHC) of the rumen after fermentation (experiment) compared to the initial minced rumen without fermentation (control).

The data in Fig. 9 demonstrate that after rumen incubation in the enzyme solution, the statistically significant improvement in the functional and technological characteristics is observed. This confirms the possibility to modify the properties of the tissue of the collagen containing rumen by its treatment with the lysate from the whole bovine abomasum. Undoubtedly, the initiator of an increase in the functional and technological properties of the rumen is the change in the collagen structure as well as smooth and striated muscle fibers, which facilitate appearance of the active functional hydro- and lipophilic groups.

Based on the obtained results of the experimental investigations, a technological scheme of bovine rumen fermentation with the pepsin solution obtained from the whole abomasa was developed (Fig. 10).

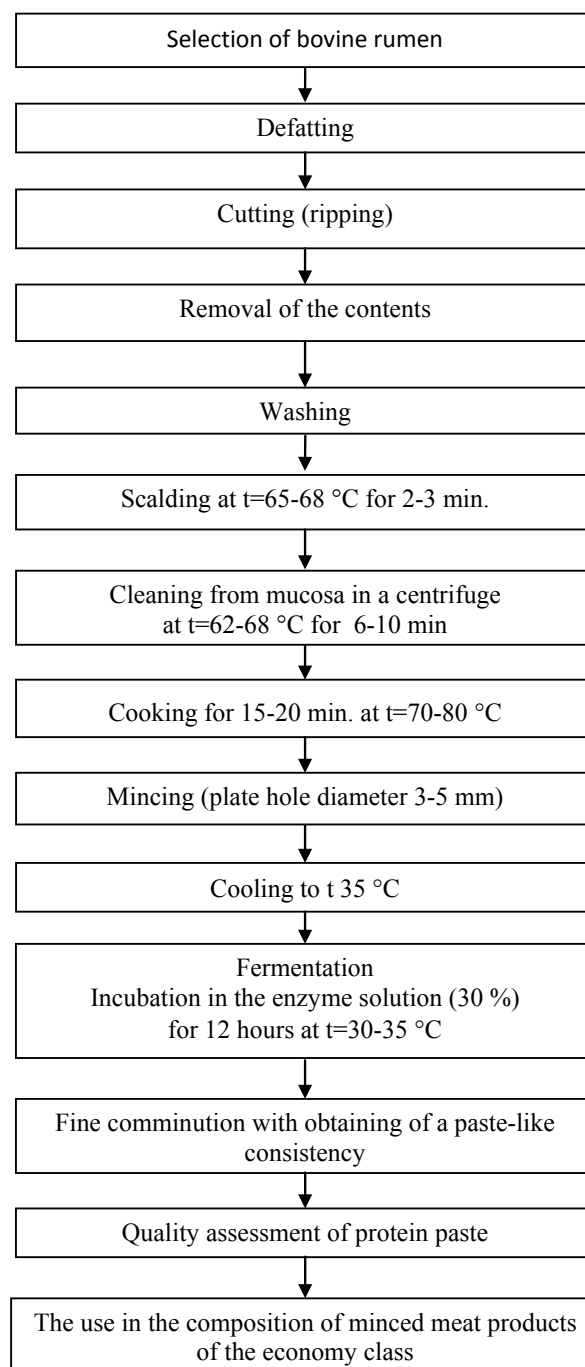


Fig. 10. The technological scheme of bovine rumen fermentation

According to the presented technological scheme, after selection, the rumens are prepared (defatted, cut, washed, scalded and cleaned from mucosa), then cooked, minced and fermented upon incubation at a substrate: enzyme solution ratio of 10:3 for 12 hours. Then, they are cooled, finely comminuted and dispersed until obtaining a paste, which can be used in production of minced meat products.

The biotechnological method of tenderization of collagen containing products plays a prominent role among the proposed methods of tenderization of tough raw materials. Researchers propose using the proteolytic enzymes of different origin individually or in combination.

The work [16] substantiates the expediency of using proteolytic enzymes of animal (collagenase from Kamchatka crab hepatopancreas) and microbial (megaterin G10X and protosubtilin G10X) origin to process low grade meat raw material with the high content of connective tissue proteins.

The author [17] shows that when treating beef with the enzyme preparation of animal origin, pepsin, swelling of muscle fibers and connective tissue occurs, which lead to an increase in hydrophilicity.

An increase in hydrophilicity and improvement of the strength properties of meat from of egg-laying hens after enzyme treatment with collagenase and trypsin was established [18].

It was revealed that the use of transglutaminase upon production of meat products increases hydrophilicity of muscle proteins due to the ability to transfer the active groups from one compound to another [19].

An effect of propionic bacteria [20] and bifidobacteria in combination with propionic bacteria, as well as pepsin and trypsin [21] on meat raw material properties was studied; an improvement in the structure of the studied tissues was established.

Disadvantages of the biotechnological method for treatment of the muscle tissue and connective tissue is expensiveness of preparations as well as selectivity of the enzyme activity. The proposed method for processing of collagen containing raw materials allows obtaining the enzyme solution, which has the high proteolytic and collagenase activities, from secondary animal raw materials with the aim of its rational use.

Conclusions

Based on the performed investigations, we propose the method for preparation of the pepsin solution from the whole bovine abomasum by infusion of the minced abomasum in the reaction solution that contains hydrochloric acid, sodium tripolyphosphate and water with the following filtration. When treating the thermally processed tissue of the collagen containing rumen with the obtained enzyme solution, the possibility to improve its functional and technological characteristics was revealed. The paste on the basis of the modified rumen can be used in formulations of minced and emulsified meat products and items from by-products (pates, liver sausages) as a source of dietary fibers. A study on the methods for the regulation of the proteolysis and collagenolysis depth with the aim of obtaining biologically active peptides can be a promising direction for further investigations.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Антипова, Л. В. (2012). Основы рационального использования вторичного коллагенсодержащего сырья мясной промышленности: монография. Воронеж, ВГТА. — 248 с.
2. Патшина, М.В. (2013). Разработка технологии вареных мясных продуктов с использованием коллагенового полуфабриката из свиной шкурки. Автореф. дис. канд. техн. наук. Кемерово, КеМТИПП. — 22 с.
3. Титов, Е.И., Апраксина, С.К., Митасева, Л.Ф., Новикова, В.Н. (2006). Рациональный способ переработки коллагенсодержащих субпродуктов. *Мясная индустрия*, 9, 28–30.
4. Антипова, Л.В., До Ле Хыу Нам (2011). Исследование возможности применения протеолитических ферментных препаратов в технологии желатина из новых видов сырьевых источников. *Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий*. 3, 12–17.
5. Чернуха, И.М., Богатырев, А.Н., Дыдыкин, А.С., Асланова, М.А., Федулова, Л.В. (2014). Влияние полипептидов, выделенных из сычуга крупного рогатого скота, на регенераторные процессы желудка крыс. *Вопросы питания*, 83 (5), 26–32.
6. Тарасова, И.В., Ребезов, М.Б., Переходова, Е.А., Косолапова, А.С., Зинина, О.В. (2014). Оценка показателей качества полуфабрикатов мясных рубленых с биомодифицированным сырьем. *Молодой ученый*, 8, 279–281.
7. Баженова, Б.А. (2014). Научное обоснование и разработка инновационных технологий продуктов из мяса яков и лошадей Бурятского экотипа. Автореферат дис. докт. техн. наук. Улан-Удэ, ВСГУТУ. — 32 с.
8. Васильева, И.О. (2011). Перспективы использования модифицированного коллагена в производстве мясных продуктов. *Вестник Российского государственного аграрного заочного университета*, 11 (16), 63–66.
9. Страйер, Л. (1984). Биохимия. Том 1. Пер. с англ. Москва, Мир. — 232 с.
10. Каспарьянц, С. А. (1989). Закономерности влияния ассоциативных и комплексообразующих свойств коллагена на его состояние и эффективное использование. Автореф. дис. докт. техн. наук. Москва, МИНХ им. Г. В. Плеханова. — 44 с.
11. ГОСТ Р 52688–2006. Препараты ферментные молоковертывающие животного происхождения сухие. Технические условия.
12. ГОСТ Р 53974–2010 Ферментные препараты для пищевой промышленности. Метод определения протеолитической активности. Технические условия.
13. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии. Ред. К. Уилсон и Дж. Уолкер; пер. с англ. — 2-е изд. Москва, Бинном. Лаборатория знаний, 2015. — 848 с.
14. Салаватулина, Р.М. (2005). Рациональное использование сырья в колбасном производстве. Санкт-Петербург, ГИОРД. — 248 с.
15. Calkins, C.R., Davis, G.V., Sanders, W.L. (1980). Fragmentation index of raw muscle as a tenderness predictor of steaks from USDA commercial and utility carcasses. *Journal of Food Science*, 45 (1), 111–114.
16. Титов, Е.И., Апраксина, С.К., Литвинова, Е.В. (2015). Влияние биомодификации на свойства коллагенсодержащего сырья. *Инновации и инвестиции*, 6, 196–199.
17. Лукин, А.А. (2012). Гистологические изменения субпродуктов II категории крупного рогатого скота под действием ферментного препарата животного происхождения. *Технология и товароведение инновационных пищевых продуктов*, 5, 28–33.
18. Жаринов, А.И., Евтихов, П.Н., Марушина, С.А., Кузнецова, Т.Г. (2002). Ферментная модификация свойств мяса кур-несушек. *Мясная индустрия*, 12, 15–17.

19. Семенова, А.А., Туниева, Е.К., Горбатов, С.А. (2011). Перспективы применения трансглутаминазы для производства мясных продуктов. *Все о мясе*, 2, 6–8.
20. Хамагаева, И.С., Ханхалаева, И.А., Хамаганова, И.В., Никифорова А.П. (2012). Применение пропионовокислых бактерий для производства продуктов из говядины. *Вестник ВСГУТУ*, 3 (38), 97.

21. Хабибуллин, Р.Э., Ежкова, М.С., Минивалеева, Э.И., Решетник, О.А. (2011). Влияние экзогенной молочнокислой ферментации на микроструктуру говяжьих субпродуктов 2 категории. *Вестник Казанского технологического университета*, 15, 189–194.

REFERENCES

1. Antipova, L.V. (2012). Principles of the rational use of the secondary collagen containing raw materials of the meat industry, monography. Voronezh, VGTA, 2012. 248 p. (in Russian).
2. Patshina, M.V. (2013). Development of the technology of cooked meat products with the use of the collagen semi-prepared product from pork skin. Author's abstract of the dissertation for the scientific degree of Candidate of Technical Sciences. Kemerovo, KemTIPP, 22 p. (in Russian).
3. Titov, E.I., Apraksina, S.K., Mitaseva, L.F., Novikova, V.N. (2006). Rational way of collagen-containing by-products processing. *Meat industry*, 9, 28–30. (in Russian).
4. Antipova, L. V., Do Le Huu Nam. (2011). Investigation ability of applying proteolysis ferments in technology gelatin from new raw resources. *Proceedings of the Voronezh State University of Engineering Technologies*, 3, 12–17. (in Russian).
5. Chernukha, I.M., Bogatyrev, A.N., Dydikin, A.S., Aslanova, M.A., Fedulova, L.V. (2014). Effect of polypeptides isolated from cattle abomasum on stomach regenerative processes in rats. *Voprosy Pitaniia*, 83 (5), 26–32. (in Russian).
6. Tarasova, I.V., Rebezov, M.B., Perekhodova, E.A., Kosolotova, A.S., Zinina, O.V. (2014). Assessment of quality indicators of minced meat semi-prepared products with bio-modified raw material. *Young Scientist*, 8, 279–281. (in Russian).
7. Bazhenova, B.A. (2014). Scientific substantiation and development of innovative technologies of meat products from yaks and horses of the Buryat ecotype. Author's abstract of the dissertation for the scientific degree of Doctor of Technical Science. Ulan-Ude, VSGUTU, 32p. (in Russian).
8. Vasilieva, I.O. (2011). Prospects for the use of the modified collagen in the production of meat products. *Herald of Russian state agrarian correspondence university*, 11 (16), 63–66. (in Russian).
9. Stryer, L. (1984). Biochemistry. Vol. 1. Translation from English. Moscow, Mir, 232 p. (in Russian).
10. Kasparyants, S. A. (1989). Regularities of the effect of associative and complex-forming properties of collagen on its condition and effective use. Author's abstract of the dissertation for the scientific degree of Doctor of Technical Science. Moscow, G.V. Plekhanov MINH, 44 p. (in Russian).
11. GOST R52688–2006. Enzyme milk-clotting of animal origin dry. Specifications. (in Russian).
12. GOST R53974–2010 Enzyme preparations for food industry. Method for determination of proteolytic activity. (in Russian).
13. Principles and techniques of biochemistry and molecular biology / edited by Keith Wilson, John Walker.— 2nd ed. Moscow, BINOM. Knowledge Laboratory, 2015, 848 p. (in Russian).
14. Salavatulina, R.M. (2005). Rational use of raw materials in sausage production. St. Petersburg, GIOR, 248 p. (in Russian).
15. Calkins, C.R., Davis, G.V., Sanders, W.L. (1980). Fragmentation index of raw muscle as a tenderness predictor of steaks from USDA commercial and utility carcasses. *Journal of Food Science*, 45 (1), 111–114.
16. Titov, E.I., Apraksina, S.K., Litvinova, E.V. (2015). An effect of biomodification on properties of collagen containing raw materials. *Innovations and Investments*, 6, 196–199. (in Russian).
17. Lukin, A.A. (2012). Histological changes offal ii category of cattle under the influence of an enzyme preparation of animal. *Technology and the study of merchandise of innovative food-stuffs*, 5, 28–33. (in Russian).
18. Zharinov, A.I. Evtihov, P.N., Marushina, S.A., Kusnetsova, T.G. (2002). Enzyme modification of properties of laying hens meat. *Meat industry*, 12, 15–17. (in Russian).
19. Semenova, A.A., Tunieva, E.K., Gorbato, S.A. (2011). Prospects for using transglutaminase for meat product manufacture. *Vsyo o myase*, 2, 6–8. (in Russian).
20. Khamagaeva, I.S., Khankhalaeva, I.A., Khamaganova, I.V., Nikiforova, A.P. (2012). The application of propionibacteria for beef products manufacture. *ESSUTM Bulletin*, 3 (38), 97. (in Russian).
21. Khabibullin, R.E., Ezhkova, M.S., Minivaleeva, E.I., Reshetnik, O.A. (2011). An effect of exogenous lactic acid fermentation on microstructure of beef by-products of the 2nd category. *Bulletin of the Technological University*, 15, 189–194. (in Russian).

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Принадлежность к организации

Баженова Баяна Анатольевна — доктор технических наук, доцент, профессор кафедры «Технология мясных и консервированных продуктов», Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления
670013, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40в
Тел.: +7-902-454-21-46
E-mail: bayanab@mail.ru
* автор для контактов

Данилов Андрей Михайлович — аспирант кафедры «Технология мясных и консервированных продуктов», Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления
670013, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40в
Тел.: +7-902-163-95-27
E-mail: andreyka.danilov.87@mail.ru

Критерии авторства

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 22.08.2017

AUTHOR INFORMATION

Affiliation

Bayana A. Bazhenova — doctor of technical Sciences, docent, Professor of the Department «Technology of meat and canned products», The East-Siberian state University of technology and management
670013, Ulan-Ude, Klyuchevskaya str., 40v
Tel: +7-902-454-21-46
E-mail: bayanab@mail.ru
* corresponding author

Andrey M. Danilov — postgraduate student of the Department «Technology of meat and canned products» The East-Siberian state University of technologies and management
670013, Ulan-Ude, Klyuchevskaya str., 40v
Tel: +7-902-163-95-27
E-mail: andreyka.danilov.87@mail.ru

Contribution

The authors equally contributed to the writing of the manuscript and are equally responsible for plagiarism.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Received 22.08.2017

КОНЦЕПТУАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К ЭКСПРЕСС-ВЫЯВЛЕНИЮ *CAMPYLOBACTER SPP.* В МЯСЕ УБОЙНЫХ ЖИВОТНЫХ

Багаева Д.С.,* Минаев М.Ю., Юшина Ю.К., Соколова О.В., Зайко Е.В.

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

Ключевые слова: бактерии рода *Campylobacter*, говядина, птица, ПЦР.

Аннотация

Современный подход формирования качества продуктов питания, основанный на стандартах ИСО серии 9000, указывает на необходимость внедрения систем менеджмента качества на перерабатывающих предприятиях. Согласно анализу баз данных научных публикаций Science Direct (by Scopus) и Web of Science установлено, что исследованию мяса убойных животных (кроме птицы) на наличие бактерий рода *Campylobacter* посвящено только 0,5–1,7 % публикаций. Приоритетным методом исследования является ПЦР. Разработана готовая к применению ПЦР тест-система для выявления *Campylobacter spp.* на основе подобранных родоспецифичных праймеров к бактериям рода *Campylobacter*. Специфичность тест-системы установлена в отношении грамотрицательных бактерий родов *Salmonella*, *Escherichia*, *Proteus*, а также оксидазоположительных *Aeromonas*. Были подобраны родоспецифичные праймеры к бактериям рода *Campylobacter* и на их основе разработана готовая к применению ПЦР тест-система. Установлено, что подобранные праймеры имеют 100 % сходимость к геному бактерий рода *Campylobacter*, эффективность ПЦР составляет не менее 95 %, предел обнаружения не более 1×10^4 КОЕ/г. При оценке специфичности праймеров учитывалось, что бактерии рода *Campylobacter* могут находиться в консорциуме, обоснованном микробиомом желудочно-кишечного тракта, в основном с бактериями семейства *Enterobacteriaceae* и молочнокислыми бактериями. Однако среда обогащения Болтон является селективной и в процессе культивирования подавляет рост Грамположительных молочнокислых бактерий. Установлено, что подобранные праймеры обладают 100 % специфичностью и не дают ложноположительных реакций с указанной группой микроорганизмов. Разработанная тест-система была успешно проверена в раунде сравнительных испытаний в системе FEPAS и внедрена в лабораторную практику. Доказано что разработанную тест-систему можно использовать как при скрининге на этапах обогащения бактерий рода *Campylobacter*, так и при идентификации чистой культуры микроорганизма.

Original scientific paper

CONCEPTUAL APPROACHES TO THE RAPID DETECTION OF *CAMPYLOBACTER SPP.* IN MEAT OF SLAUGHTER ANIMALS

Dagmara S. Bataeva,* Mihail Yu. Minaev, Yuliya K. Yushina, Olga V. Sokolova, Elena V. Zajko

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

Key words: of the genus *Campylobacter*, beef, poultry, PCR.

Abstract

The modern approach to quality assurance of food products based on the ISO 9000 standards indicates the need for the implementation of quality management systems in processing plants. According to the analysis of scientific publication databases (Science Direct and Web of Science), it is established that only 0.5–1.7 % of publications are related to studying meat of slaughter animals (except for birds) concerning the presence of *Campylobacter*. The priority method of investigation is PCR. Ready-to-use PCR test system was developed for the detection of *Campylobacter spp.* on the basis of selected gene-specific primers to bacteria of *Campylobacter* genus. Specificity of the test system is established for Gram-negative bacteria of *Salmonella*, *Escherichia*, and *Proteus* genera, and for oxidase-positive *Aeromonas*. Gene-specific primers for *Campylobacter* were selected and ready-to-use PCR test system was developed on their basis. It was found that the selected primers have 100 % convergence to the genome of *Campylobacter* genus bacteria, the PCR efficiency is not less than 95 %, and the detection limit is not more than 1×10^4 CFU/g. When estimating the specificity of the primers, it was taken into account that the bacteria of *Campylobacter* genus may be incorporated in a consortium with intestine microbiome, mainly with *Enterobacteriaceae* and lactic acid bacteria. However, Bolton's enrichment medium is selective and, during the cultivation process, suppresses the growth of Gram-positive lactic acid bacteria. It was found that the selected primers were 100 % specific and did not give false positive reactions with this group of microorganisms. The developed test system was successfully validated in a cycle of qualitative tests in the FEPAS system and implemented into laboratory practice. It was proved that the developed test system may be used both in screening at the stages of *Campylobacter* enrichment and in identification of pure culture of the microorganism.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Багаева Д.С., Минаев М.Ю., Юшина Ю.К., Соколова О.В., Зайко Е.В. Концептуальные подходы к экспресс-выявлению *Campylobacter spp.* в мясе убойных животных. Теория и практика переработки мяса. 2017;2(4):76-95. DOI:10.21323/2414-438X-2017-2-4-76-95

FOR CITATION: Bataeva D.S., Minaev M.Yu., Yushina Yu.K., Sokolova O.V., Zajko E.V. Conceptual approaches to the rapid detection of *Campylobacter spp.* in meat of slaughter animals. *Theory and practice of meat processing*. 2017;2(4):76-95. (In Russ.) DOI:10.21323/2414-438X-2017-2-4-76-95

Введение

Прогрессирующий мутагенез патогенных микроорганизмов пищевого происхождения представляет пандемическую опасность для современного мира. Проявляя стремительную изменчивость, как на генетическом, так и на фенотипическом уровне, патогены приобретают устойчивость к различным факторам воздействия, в т. ч. и окружающей среды. Это приводит к расширению ареала их распространения.

Ряд микроорганизмов в настоящее время являются наиболее опасными в связи с их широким распространением в природной среде, высокой выживаемостью и патогенностью. К таким микроорганизмам относят и бактерии семейства капнофильных эпсилон-протеобактерий *Campylobacterales*, в частности бактерии рода *Campylobacter* и *Helicobacter* [1].

Кроме того, Всемирная Организация Здравоохранения выделяет среди патогенных микроорганизмов несколько наиболее опасных, с точки зрения возрастающей устойчивости, в число которых входят и бактерии рода *Campylobacter* [2].

В отчете ВОЗ «Глобальный взгляд на кампилобактериоз» отмечено, что кампилобактериоз является недооцененным заболеванием. Частота инфицирования возбудителем этого заболевания населения стремительно растет. В отчете выделяют два вида, такие как *C. jejuni* и *C. coli* как наиболее опасные, несмотря на то что из 16 видов *Campylobacter* двенадцать считаются патогенными [3, 4].

Бактерии рода *Campylobacter*, во всем мире рассматриваются как наиболее распространённые пищевые патогены, вызывающие заболевание кампилобактериоз (вибриоз) со следующим патогенезом: кишечные инфекции, энтериты, бактериемию, колиты, септические артриты, гемоуремический синдром. В осложненных случаях может вызывать синдром Рейтера или Гийена-Барре. В отдельных случаях возможен летальный исход, в основном у групп населения, входящих в группу риска по причине ослабленного иммунитета. Согласно информационному бюллетеню ВОЗ, источником заражения соответственно и причинами гастроэнтеритов обычно является мясо птицы, прошедшее недостаточную термообработку [5].

В 2007 году Международные Комиссии Codex Alimentarius Commission (CAC) и Codex Committee on Food Hygiene призвали к более тщательному изучению и контролю бактерий рода *Salmonella* и *Campylobacter* [6, 7].

Исследованиями 148 проб пищевых продуктов (листовые салаты, овощи, сырое молоко, мясо цыплят, куриные сырые субпродукты, индейка, перепела, говядина и смывы с различных поверхностей), проведенных в «ФИЦ питания и биотехнологии», установлена их контаминация и выявлено 50 штаммов бактерий рода *Campylobacter*, большая часть которых была представлена видом *C. jejuni*. Чаще всего в пище-

вые продукты кампилобактерии попадают в результате контаминации, в том числе с поверхности основного и вспомогательного оборудования. *Campylobacter jejuni* является наиболее патогенным представителем своего рода в связи широкой лекарственной устойчивостью к противомикробным препаратам, в т.ч. к хинолонам [8, 9].

Принимая во внимание, что птица (особенно перелетная) может быть переносчиком кампилобактерий, характер распространения этого патогена среди животных стремительный, и сложно контролируемый [4].

В связи с зоонозной природой патогена и широкой распространенностью, фактор риска заражения кампилобактериями сохраняется на любом предприятии, перерабатывающем мясо, особенно птицы. Также важно учитывать устойчивость этих бактерий к условиям окружающей среды. Кампилобактерии способны выживать в широком диапазоне температур от 4 до 43 °С. Из-за этой особенности их относят к термотолерантным микроорганизмам. Во влажных природных объектах (вода, навоз, почва, сено и проч.) при температуре 18–27 °С *Campylobacter* выживают более месяца; в продуктах животного происхождения при температуре 4 °С — 21 сутки, при 20 °С — не менее 12 недель. В инфицированных тканях кампилобактерии выживают до года. Однако, бактерии рода *Campylobacter* чувствительны к антибиотикам и дезинфицирующим средствам, а также к воздействию ультрафиолетовых лучей [10, 11].

По последним данным бактерии рода *Campylobacter* встречаются не только у птицы, но и почти всех теплокровных животных: крупный рогатый скот, свиньи, овцы, страусы, домашние животные (кошки, собаки). Путь передачи возбудителя кампилобактериоза чаще всего алиментарный. Дикие и перелетные птицы при испражнении кишечника инфицируют природные объекты. Заражение других животных происходит при поедании зараженной растительности. Среди домашнего скота достаточно широко распространен венерический путь передачи, со спермой зараженного самца. Локализуются кампилобактерии в основном в кишечнике, репродуктивных органах и в лимфатической системе [5, 12, 13, 14].

Учитывая патогенность кампилобактерий и характер заболевания людей в пищевой микробиологии используются различные подходы для обнаружения бактерий рода *Campylobacter* в объектах пищевой цепи человека и животных. Прежде всего, это классические методы микробиологической практики, которые описаны в ISO 10272-1:2006(en) Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. — Part 1: Detection method, с учетом изменений внесенных в 2017 году. С момента публикации при определении кампилобактерий необходимо будет использовать ISO 10272-1:2017(en) Microbiology of the

food chain — Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter spp.* — Part 1: Detection method [15]. Количественный и полуколичественный учет осуществляется по ISO 10272-2:2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter spp.* — Part 2: Colony-count technique (Микробиология пищевой цепи — Горизонтальный метод обнаружения и подсчета *Campylobacter spp.* — Часть 2: Метод подсчета колоний), ISO/TS10272-3:2010 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter spp.* — Part 3: Semi-quantitative method (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных — Горизонтальный метод обнаружения и перечисления *Campylobacter spp.* — Часть 3: Полуколичественный метод). В России выявление и определение количества бактерий рода *Campylobacter* проводят в соответствии с тремя микробиологическими ГОСТами: ГОСТ ISO 10272-1-2013, ГОСТ ISO/TS10272-2-2013 и ГОСТ Р 55027-2012/ISO/TS10272-3:2010. Кроме классических методов, для обнаружения кампилобактерий используют и альтернативные (быстрые) методы, например ПЦР-анализ в реальном времени и иммунохроматографические экспресс-тесты.

Анализ литературных источников показал, что научный интерес заостряется на определении и идентификации кампилобактерий в птице. В среднем на эти исследования приходится 98,3–99,5 % от общего числа исследований на кампилобактерии среди убойных животных. Причем более трети из них в последние годы проводились с применением ПЦР (Рис. 1). Исследований мяса убойных животных, за исключением птицы, на наличие кампилобактерий практически не проводились. Вероятнее всего на это повлиял низкий уровень выявляемости *Campylobacter spp.* в красном мясе, что может быть объяснимо разными подходами к отбору проб и пробоподготовки при исследовании мяса птицы и всех остальных убойных животных. Отбор проб и пробоподготовку мяса и мясной продукции проводят в соответствии с ISO 6887-2 из глубоких слоев и/или с поверхности. При этом отбор глубоких слоев осуществляют после обеззараживания поверхности объекта исследования. Все мясо убойных животных на патогенные микроорганизмы отбирается именно так. Как было сказано выше, бактерии рода *Campylobacter* не локализуются в мышечных тканях, а контаминируют ее при нутровке. В связи с этим отбор проб мяса должен осуществляться с не обеззараженной поверхности. Однако исследования мяса птицы в основном осуществлялся путем взятия смывов или ополаскиванием, что и способствовало высокой выявляемости искомого патогена.

Несмотря на очевидную необходимость ужесточения контроля *Campylobacter spp.* на предприятиях мясоперерабатывающей отрасли, диагностирование

кампилобактерий затруднительно. Это связано с их прихотливостью. Являясь капнофильными микроаэробными микроорганизмами, для роста и развития они требуют создания модифицированной газовой среды, с повышенным содержанием углекислого газа и сниженной концентрацией кислорода. Кроме этого, для наращивания биомассы необходимы специализированные питательные среды такие как, например, бульон Престона (Preston broth) или бульон Болтона (Bolton broth) на этапе предварительного обогащения и специализированные агаризованные среды (Мюллера-Хинтона агар, Угольный агар), для выявления *Campylobacter fetus* необходимы среды с использованием дебибрированной крови, такие как колумбийский агар с кровью. Это все делает анализ на выявление кампилобактерий материальнозатратным, длительным и сложным в исполнении.

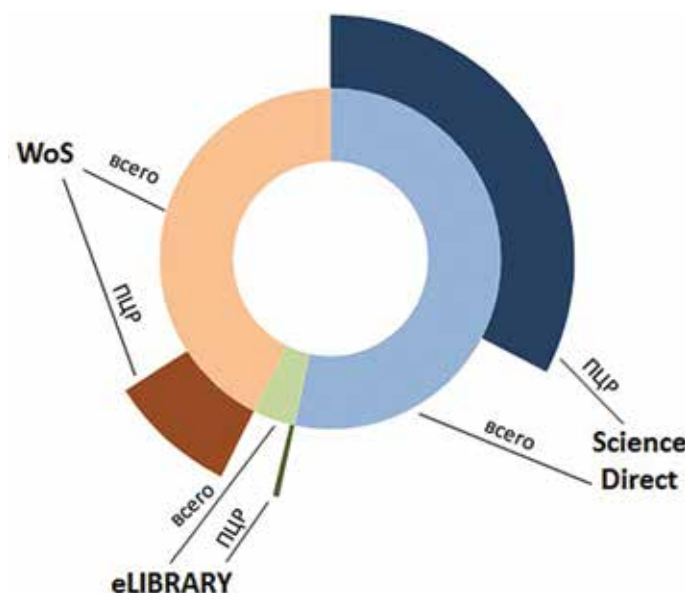


Рис. 1. Анализ публикационной активности по проблематике *Campylobacter* в международных базах цитирования за последние 10 лет

Наиболее перспективным методом для выявления кампилобактерий является ПЦР. В настоящее время при контроле бактерий рода *Campylobacter* методом ПЦР необходимо пользоваться методикой, описанной в МУК 4.2.2872-11. Преимущество методики заключается в отсутствии необходимости селекции и изоляции *Campylobacter* из пула микроорганизмов. Недостатком методики являлось отсутствие готовой к использованию тест-системы ПЦР для выявления *Campylobacter*.

Целью нашей работы являлась разработка полноценной ПЦР тест-системы для выявления бактерий рода *Campylobacter* в пищевой продукции.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись тест-штаммы чистых культур патогенных микроорганизмов: *Campylobacter jejuni subspecies jejuni* 70.2T; *Salmonella enteri-*

ca subsp. enterica serovar Typhimurium ATCC14028; *Escherichia coli* ATCC 25922; *Proteus mirabilis* ATCC35659; *Aeromonas salmonicida* s1; образцы птицы («А», «В», «С») предположительно обсемененные бактериями рода *Campylobacter*; продукты амплификации штаммов; выделенные ДНК штаммов микроорганизмов.

При проведении исследования использовали микробиологический метод обнаружения бактерий рода *Campylobacter* согласно ИСО 10272:1. Первичное обогащение проводили в селективной жидкой среде Bolton broth (CM 0983, OXOID) в две стадии. Первую стадию инкубирования проводили при температуре $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 4–6 ч, на второй стадии — при температуре $(41,5 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение (44 ± 4) ч. После чего производили пересев на плотные селективные питательные среды (Preston agar и mCCD agar) и культивировали при температуре $(41,5 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 44 ± 4 ч в условиях модифицированной газовой атмосферы. Для создания модифицированной газовой атмосферы применяли коммерческие газогенераторы.

В результате культивирования получали изолированные колонии, которые идентифицировали с использованием коммерческих тест-систем api (Biomerieux, Франция).

Для проведения ПЦР, культуральную жидкость, полученную на этапе первичного обогащения использовали для получения биомассы клеток микроорганизмов и последующего выделения из нее ДНК. Для этого отбирали культуральную жидкость объемом $1,0 \text{ см}^3$ в стерильные центрифужные пробирки и центрифугировали в течение 5 мин при 6,5 тыс. оборотах (Eppendorf). Полученный супернатант удаляли, получая концентрат биомассы. Принимая во внимание, что в концентрате могут находиться компоненты питательной среды, полученные образцы биомассы подвергали промывке. Для этого к декантанту добавляли стерильный физиологический раствор, суспендировали встряхиванием, после чего повторно центрифугировали при тех же режимах. Из полученного, после слива промывного физиологического раствора, концентрата выделяли ДНК.

Так же для проведения ПЦР проводили отбор типичных колоний с агаризованных селективных сред и готовили суспензию микроорганизмов с заданным титром в стерильном физиологическом растворе. Для определения титра микроорганизмов применяли ме-

тод сравнения со стандартом мутности № 1 McFarland (Biomerieux, Франция), эквивалентным, 3×10^8 бактериальных клеток в 1 см^3 суспензии. Полученную суспензию центрифугировали, получая концентрат биомассы микроорганизмов. Из полученного концентрата выделяли ДНК.

Согласно литературному поиску, бактерии рода *Campylobacter* способны взаимодействовать по принципу комменсализма или находится в консорциуме кишечного микробиома с другими патогенными микроорганизмами. В связи с этим при анализе генома *Campylobacter* проводили сравнение с бактериями родов *Escherichia*, *Salmonella*. Для проведения ПЦР в отношении этих микроорганизмов музейные культуры были рекультивированы на плотной питательной среде Trypton-soya agar (TSA), после чего создавали суспензию клеток с заданным титром в физиологическом растворе методом аналогичным тому, который использовали для получения суспензии клеток *Campylobacter*.

Для выделения ДНК подготавливали суспензию клеток объемом 50 мкл. Выделение ДНК проводили методом магнитных частиц на роботизированной станции MagNA Pure LC2.0 Instrument (Roche, Швейцария), используя набор для выделения ДНК MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Roche, Швейцария).

Анализ генома и согласование дизайна комплиментарных праймеров к *Campylobacter* осуществляли с помощью программ Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) и Oligo Analyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/calc/analyser>).

Для получения фрагментов ДНК использованы универсальные праймеры (Табл. 1) и родоспецифичные праймеры (Табл. 2.) к гену 16S rDNA.

Выбранные родоспецифичные праймеры к гену 16S rDNA бактерий рода *Campylobacter* были использованы для проведения ПЦР в реальном времени. Условия и режимы проведения ПЦР реакции приведены в Табл. 3. Температуру плавления определяли *in silico* с применением интерактивной программы uMELTSM (<https://dna.utah.edu/umelt/um.php>).

Чистоту полученных ПЦР-продуктов (ампликонов) проверяли методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле с использованием TBE — буфера (Thermo Scientific, США). Для окрашивания ПЦР-продуктов использовали краситель SYBRGreen I (Силекс, Россия). Объем вносимого образца в каждую из трех лунок геля

Таблица 1. 16S rDNA праймеры, использованные для получения фрагментов ДНК бактерий рода *Campylobacter*

Forward primer	TACGGGAGGCAGCAG	Plus	15	2	16	54.37	66.67	3.00	2.00
Reverse primer	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT	Minus	20	566	547	54.11	40.00	4.00	0.00
Product length	565								

Таблица 2. Родоспецифичные праймеры к гену 16S rDNA бактерий рода *Campylobacter*, использованные для проведения ПЦР в реальном времени:

Forward primer	GTTAAGTCCCGCAACGAGC	Plus	19	463	481	59.21	57.89	4.00	2.00
Reverse primer	GGCTGATCTACGATTACTAGCGA	Minus	23	735	713	59.56	47.83	4.00	2.00
Product length	273								

составлял 15 мкл. Для индукции излучения флуоресцирующего света из красителя использовали трансиллюминатор ETX-F26 (Vilber Lourmat, Франция).

Таблица 3. Условия и режимы проведения ПЦР

При наработке ПЦР фрагментов для дальнейшего секвенирования:			
Состав реакционной смеси:		Условия ПЦР	
Q5 ПЦР буфер×2,0	12,5 мкл	98	120
Вода	7 мкл	Денатурация	
Prmix	3 мкл	54	30
ДНК	2 мкл	72	20
Eva-green краситель	0,5 мкл	98	15
30 циклов			
При проведении ПЦР в реальном времени:			
Состав реакционной смеси:		Условия ПЦР	
PC×2,5	10 мкл	95	400
Вода	15 мкл	60	40
Prmix	3 мкл	95	15
ДНК	2 мкл	40 циклов	
Eva-green краситель	0,4 мкл		
Taq-полимераза	0,4 мкл		

Для первичной очистки фрагментов ДНК использовали набор Cleanup Standart (Евроген, Россия). Для этого на колонку наносили не более 200 мг агарозного геля и проводили очистку в соответствии с рекомендациями производителя согласно инструкции к набору с некоторыми изменениями. Для настоящего исследования было увеличено время центрифугирования на всех этапах с 30 с на 60 с; элюирующий раствор предварительно нагревали до 55 °С; после первичного добавления элюирующего буфера образцы выдерживали 5 мин. В результате получали три пробы равного объема, которые объединяли. Общий объем объединенной пробы составил 600 мкл.

Вторую стадию колоночной очистки проводили с помощью набора MinElute Purification Kit (Qiagen, США) согласно протоколу. В колонку вносили 600 мкл образца, полученного после первичной очистки. Объем элюирующего буфера, вносимого на мембрану на второй стадии очистки, был увеличен, и составил 15 мкл.

Определение концентрации очищенных ПЦР-продуктов проводили фотометрическим методом с использованием фотометра Qubit 3.0 (Thermo Scientific, США) согласно протоколу к набору Qubit dsDNA HS Assay Kits (Thermo Scientific, США).

Результаты и обсуждение

Для генотипирования контрольного штамма *Campylobacter jejuni subspecies jejuni* 70.2T была выделена его ДНК и поставлена ПЦР с выбранными универсальными праймерами к гену 16S РНК прокариот. Сходимость выбранных форвард и реверс праймеров представлена на Рис. 2 и Рис. 3.

Из данных представленных на Рис. 2 и Рис. 3 видно, что форвард праймер обладает 100 % сходимостью с *Campylobacter*, а реверс праймер имеет сходимость на 95 %. В связи с тем, что реверс праймер не дает полную сходимость с *Campylobacter* был проанализирован системный мисматч участка несходимости. Результаты представлены на Рис. 4.

Расположение мисматча в 5' области праймера позволило использовать универсальные праймеры для получения продуктов амплификации для секвенирования.

В результате секвенирования, проведенного совместно с ЗАО «Евроген», очищенных фрагментов ДНК штамма *Campylobacter jejuni subspecies jejuni* 70.2T, была установлена его нуклеотидная последовательность

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Campylobacter sputorum strain RM8705, complete genome	30.2	90.7	100%	0.57	100%	CP019685.1
☐	Campylobacter sputorum by paraureolyticus LMG 11764 strain LMG 17589, complete genome	30.2	90.7	100%	0.57	100%	CP019684.1
☐	Campylobacter sputorum by faecalis CCUG 20703, complete genome	30.2	90.7	100%	0.57	100%	CP019683.1
☐	Campylobacter sputorum by sputorum RM3237, complete genome	30.2	90.7	100%	0.57	100%	CP019682.1
☐	Campylobacter jejuni strain FORC_045, complete genome	30.2	112	100%	0.57	100%	CP017229.1
☐	Campylobacter jejuni strain 11643 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	30.2	30.2	100%	0.57	100%	MF372576.1
☐	Campylobacter jejuni strain 11657 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	30.2	30.2	100%	0.57	100%	MF372575.1
☐	Campylobacter jejuni strain 11024 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	30.2	30.2	100%	0.57	100%	MF372574.1
☐	Campylobacter jejuni strain 11044 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	30.2	30.2	100%	0.57	100%	MF372573.1
☐	Campylobacter jejuni strain 13775 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	30.2	30.2	100%	0.57	100%	MF372572.1
☐	Campylobacter jejuni subsp. jejuni strain FDAARGOS_265, complete genome	30.2	90.7	100%	0.57	100%	CP022070.1
☐	Campylobacter jejuni subsp. jejuni strain FDAARGOS_262, complete genome	30.2	90.7	100%	0.57	100%	CP022076.1
☐	Campylobacter jejuni subsp. jejuni strain ATCC 35925, complete genome	30.2	114	100%	0.57	100%	CP020045.1
☐	Campylobacter jejuni strain NCTC12862, complete genome	30.2	114	100%	0.57	100%	CP019985.1
☐	Campylobacter coli strain aerotolerant OR12, complete genome	30.2	90.7	100%	0.57	100%	CP019977.1
☐	Campylobacter pinnipediorum subsp. pinnipediorum strain RM17262, complete genome	30.2	111	100%	0.57	100%	CP012548.1

Рис. 2. Оценка специфичности форвард праймера для секвенирования

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐ Campylobacter jejuni strain 11643 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.001	100%	MF372576.1
☐ Campylobacter jejuni strain 13774 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.001	100%	MF372572.1
☐ Uncultured Campylobacter sp. clone 4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.001	100%	KC535089.1
☐ Uncultured Campylobacter sp. isolate DGGF gel band S9J4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.001	100%	EF531939.1
☐ Campylobacter coli strain BG2108, complete genome	32.2	271	100%	0.36	95%	CP017878.1
☐ Campylobacter coli strain ZV1224, complete genome	32.2	328	100%	0.36	95%	CP017875.1
☐ Campylobacter coli strain WA333, complete genome	32.2	303	100%	0.36	95%	CP017873.1
☐ Campylobacter coli strain BP3183, complete genome	32.2	319	100%	0.36	95%	CP017871.1
☐ Campylobacter coli strain YF2105, complete genome	32.2	271	100%	0.36	95%	CP017865.1
☐ Campylobacter jejuni strain C:J677CC078, complete genome	32.2	344	100%	0.36	95%	CP010507.1
☐ Campylobacter jejuni strain C:J677CC538, complete genome	32.2	344	100%	0.36	95%	CP010485.1
☐ Campylobacter coli strain OR12, complete genome	32.2	372	100%	0.36	95%	CP013733.1
☐ Campylobacter lari RM16712, complete genome	32.2	433	100%	0.36	95%	CP007778.1
☐ Campylobacter lari RM16701, complete genome	32.2	297	100%	0.36	95%	CP007777.1
☐ Campylobacter lari NCTC 11845, complete genome	32.2	459	100%	0.36	95%	CP007775.1
☐ Campylobacter volutans LMG 24379, complete genome	32.2	390	100%	0.36	95%	CP007774.1
☐ Campylobacter subantarcticus LMG 24377, complete genome	32.2	483	100%	0.36	95%	CP007773.1
☐ Campylobacter subantarcticus LMG 24374, complete genome	32.2	465	100%	0.36	95%	CP007772.1
☐ Campylobacter lari subsp. concheus LMG 11760, complete genome	32.2	370	100%	0.36	95%	CP007771.1

Рис. 3. Оценка специфичности реверс праймера для секвенирования *Campylobacter*

Campylobacter coli strain BG2108, complete genome
Sequence ID: [CP017878.1](#) Length: 1695638 Number of Matches: 11

Range 1: 1114526 to 1114545 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
32.2 bits(16)	0.36	19/20(95%)	0/20(0%)	Plus/Plus

Query 1: CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 20
 ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1114526 CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 1114545

Рис. 4. Системный мисматч универсального реверс праймера

и подтверждена видовая принадлежность исследуемого штамма. Это позволило использовать его в качестве положительного контроля при разработке родоспецифичной к *Campylobacter* spp. ПЦР тест-системы.

При подборе родоспецифичных праймеров по базе данных NCBI была выбрана более консервативная последовательность 16S rDNA ITS, т.к. конститутивные гены *Campylobacter* (housekeeping genes) обладают высокой видовой специфичностью. Результаты изучения сходности подобранных родоспецифичных форвард и реверс праймеров по отношению к различным видам бактерий рода *Campylobacter* представлены на Рис. 5 и Рис. 6.

Из представленных данных видно, что выбранные родоспецифичные праймеры обладают 100 % сходностью с геномом бактерий рода *Campylobacter*.

ic|Query_4139

Link To This View | Feedback

Query_4139 Find: [Tools](#) [Tracks](#) [Help](#)

Sequence

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

G T T A A G T C C C G C A A C G A G C

C A A T T C A G G G C G T T G C T C G

BLAST Results for: Nucleotide Sequence (19 letters)

[CP017878.1](#)

[CP017878.1](#)

Рис. 5. Сходимость родоспецифичного форвард праймера к геному бактерий рода *Campylobacter*

ic|Query_42769

Link To This View | Feedback

Query_42769 Find: [Tools](#) [Tracks](#) [Help](#)

Sequence

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

G C G A T T C C G G C T T C A T G C T C

C G C T A A G G C C G A A G T A C G A G

BLAST Results for: Nucleotide Sequence (20 letters)

[CP022551.1](#)

[CP022551.1](#)

[CP022551.1](#)

Рис. 6. Сходимость родоспецифичного реверс праймера к геному бактерий рода *Campylobacter*

Для расчета чувствительности и эффективности ПЦР реакции с родоспецифичными праймерами была проведена ПЦР с использованием ряда десятикратных разведений ДНК. Результаты чувствительности праймеров представлены на Рис. 7.

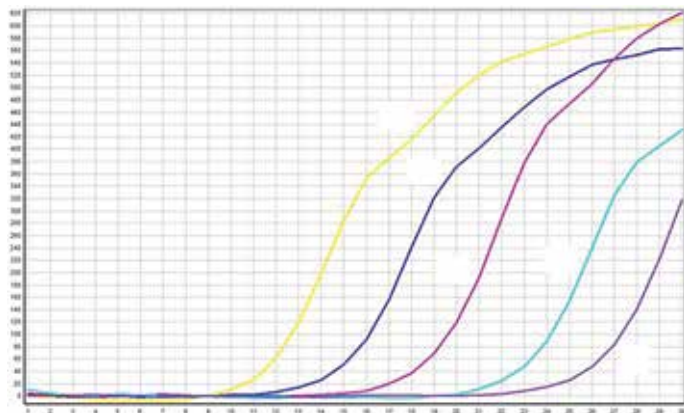


Рис. 7. Результаты чувствительности родоспецифических праймеров для *Campylobacter*

Проанализировав данные представленные на Рис. 7, пятое разведение ДНК было принято за нижший предел обнаружения метода ПЦР, эквивалентной 1×10^4 бактериальных клеток в 1 см^3 суспензии.

Полученные результаты ПЦР в реальном времени коррелируют с расчетными данными и подтверждают 100 %-ную специфичность подобранных праймеров к бактериям рода *Campylobacter*. Эффективность ПЦР составляет не менее 95 % (Рис. 8).

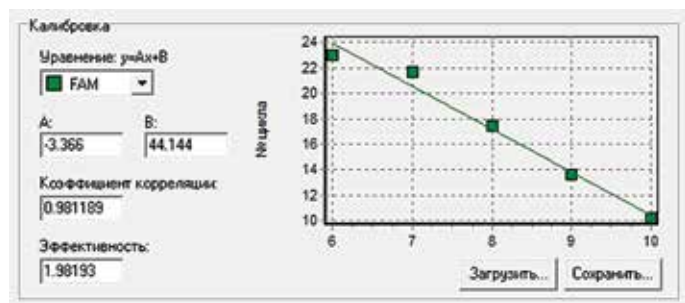


Рис. 8. Кривая расчетной эффективности ПЦР реакции

Для определения уникальности ПЦР реакции проведена серия сравнительных экспериментов с применением микроорганизмов, которые могут обнаруживаться в пробах наряду с *Campylobacter* (Рис. 9). Наиболее часто встречаются ассоциаты микробиома кампилобактерий с бактериями родов *Salmonella* и *Escherichia*. В связи с этим представляло интерес провести ПЦР исследование с выбранными родоспецифичными праймерами в отношении бактерий родов *Salmonella* и *Escherichia*

Анализ данных, полученных в результате ПЦР (Рис. 9) показал, что выбранные праймеры дают положительную реакцию на бактерии родов *Salmonella* и *Escherichia*. Следовательно, специфичность реакции при использовании данных праймеров не подтвердилась.

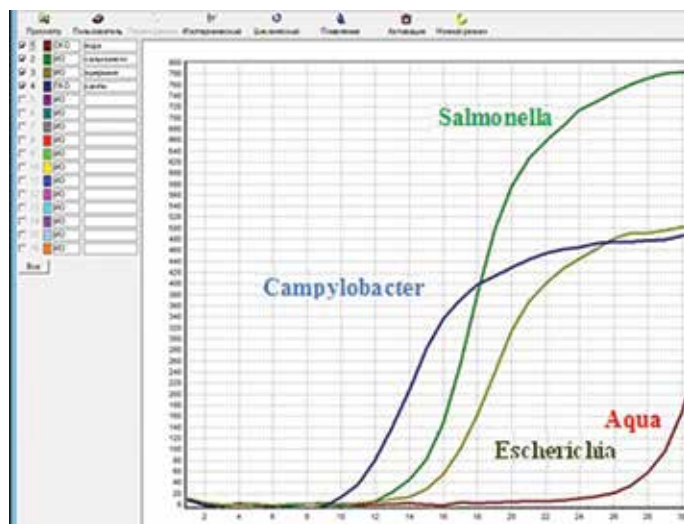


Рис. 9. Результаты ПЦР исследования с применением универсальных родоспецифичных праймеров

Для подбора специфичных праймеров, участок 16S ДНК *Campylobacter* был выровнен на гомологичные участки 16S ДНК бактерий родов *Salmonella*, *Escherichia* и *Aeromonas* (Рис. 10).

В результате выравнивания было установлено, что реверс праймер имеет всего два мисматча в отношении гомологичных участков ДНК бактерий, расположенных в 5' области праймера. Данная последовательность не обладает должной специфичностью, в связи с чем, при её использовании тест-система будет давать ложноположительной реакции.

Во избежание получения ложноположительной реакции, было принято решение сдвинуть область комплементарного связывания праймера по 3' области с позиции 1338 на 16 базовых пар нуклеотидов в позицию 1322 (Рис. 11).

Из представленных данных видно, что новый реверс праймер имеет 3 мисматча в отношении гомологичных участков ДНК бактерий *Salmonella*, *Escherichia* и *Aeromonas*, расположенных в 3' области праймера, отвечающей за специфичный отжиг.

Для подтверждения специфичности ПЦР реакции с новыми подобранными праймерами после выравнивания гомологичных участков ДНК была проведена постановка ПЦР с бактериями родов *Salmonella*, *Escherichia* и *Campylobacter* (Рис. 12).

Отмечено, что новые подобранные праймеры обладают специфичностью по отношению к бактериям рода *Salmonella* и *Escherichia*. Полученные результаты амплификации позволяют утверждать, что использование новых подобранных праймеров исключает ошибку диагностики при дифференциации рода *Campylobacter* от бактерий родов *Salmonella* и *Escherichia*.

Принимая во внимание, что *Campylobacter* может встречаться в смешанной культуре с бактериями родов *Proteus* и *Aeromonas*, была проведена сравнительная межродовая диагностика путем постановки ПЦР с выбранными праймерами (Рис. 13).

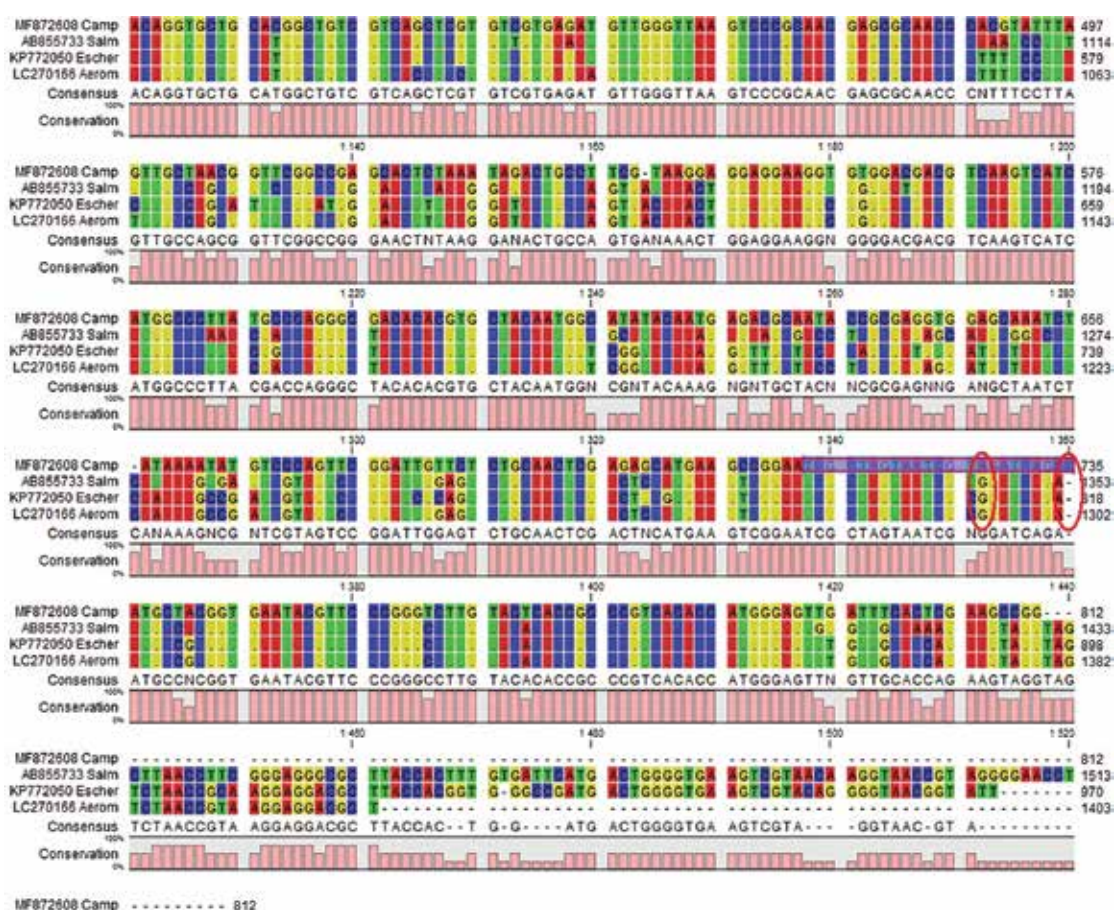


Рис. 10. Вываривание гомологичных участков ДНК бактерий родов *Salmonella*, *Escherichia*, *Aeromonas* и *Campylobacter* содержащих участок отжига универсального реверс праймера

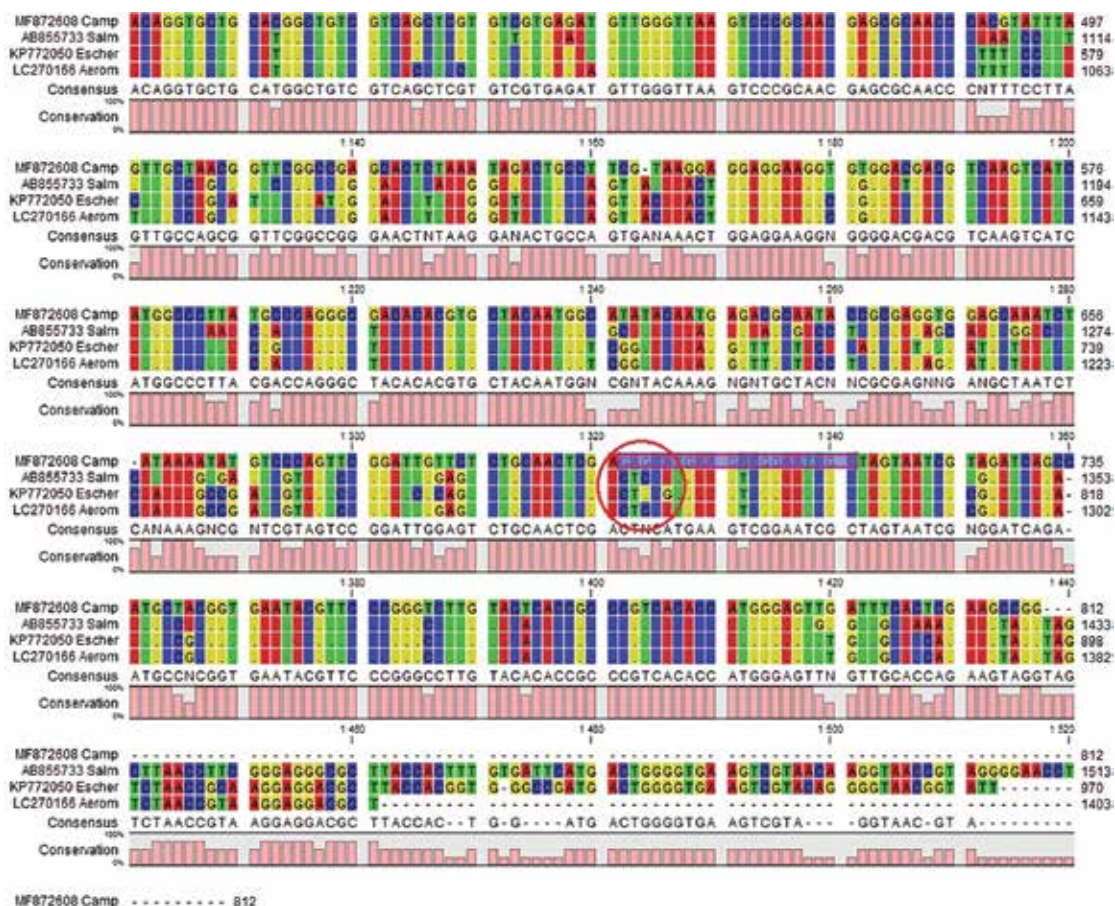


Рис. 11. Вываривание гомологичных участков ДНК бактерий родов *Salmonella*, *Escherichia*, *Aeromonas* и *Campylobacter* содержащих участок отжига реверс праймера

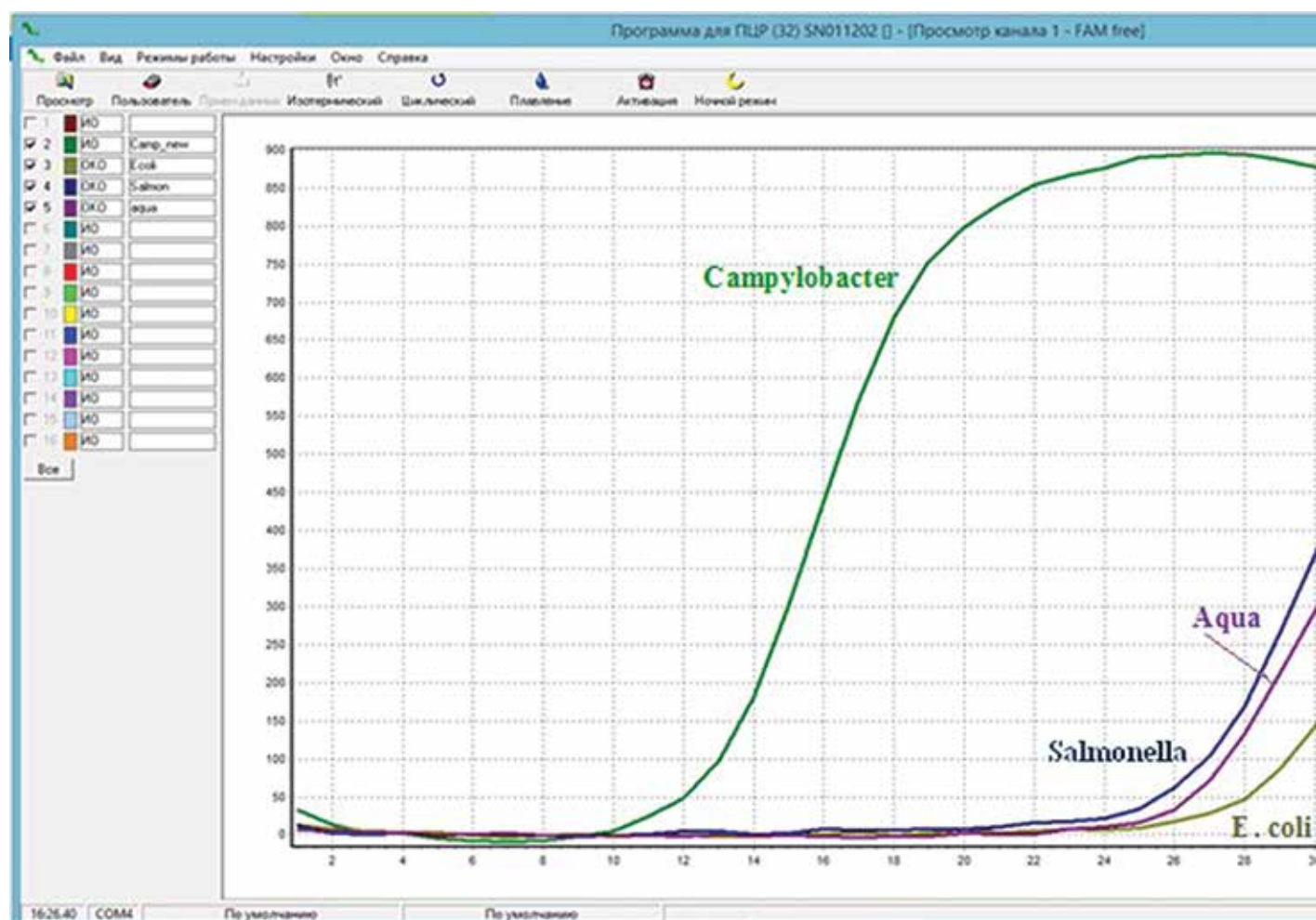


Рис. 12. Результаты амплификации *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* и *Escherichia coli*

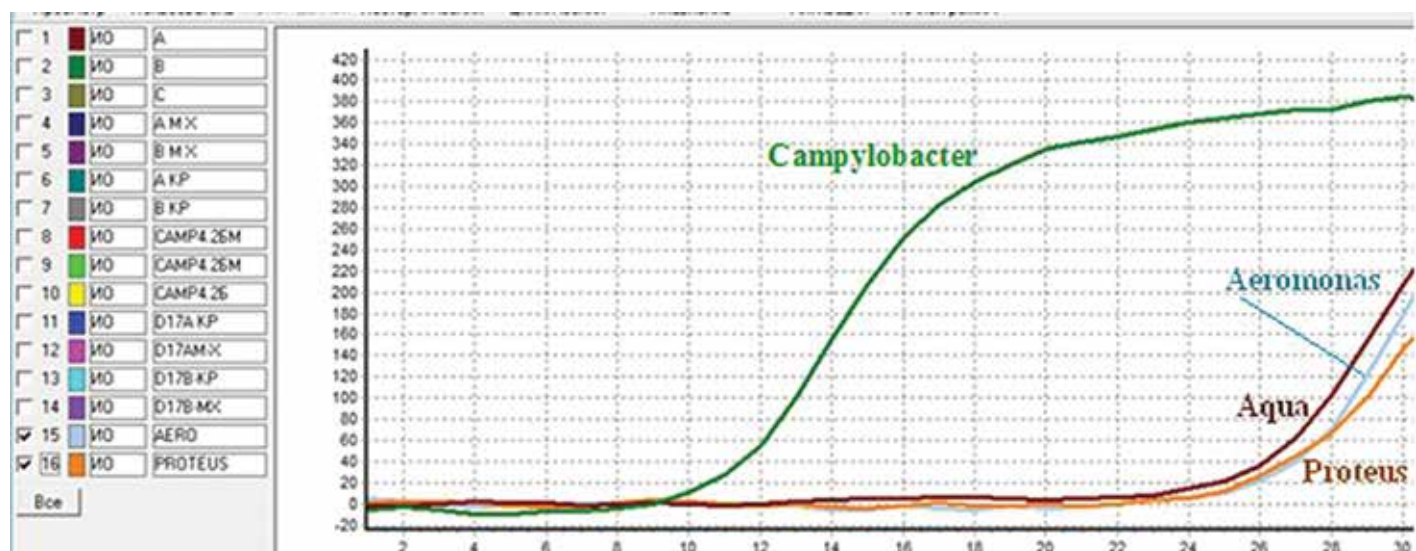


Рис. 13. Результаты амплификации *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas salmonicida* и *Proteus mirabilis*

Данные представленные на рисунке, доказывают, что выбранные праймеры обладают высокой специфичностью в отношении бактерий рода *Aeromonas* и *Proteus*.

Для оценки диагностических возможностей разработанной ПЦР тест-системы была проведена серия сличительных испытаний с традиционным микробиологическим методом выявления бактерий рода *Campylobacter*.

Как видно из данных ПЦР исследования, представленных на Рис. 14, только проба «В» дала положительную реакцию амплификации, что свидетельствует о наличии в ней бактерий рода *Campylobacter*. Пробы «А» и «С» дали отрицательную реакцию при проведении ПЦР, что подтверждает отсутствие *Campylobacter spp.*

Параллельно с ПЦР-анализом было проведено исследование проб «А», «В» и «С» культуральным мето-

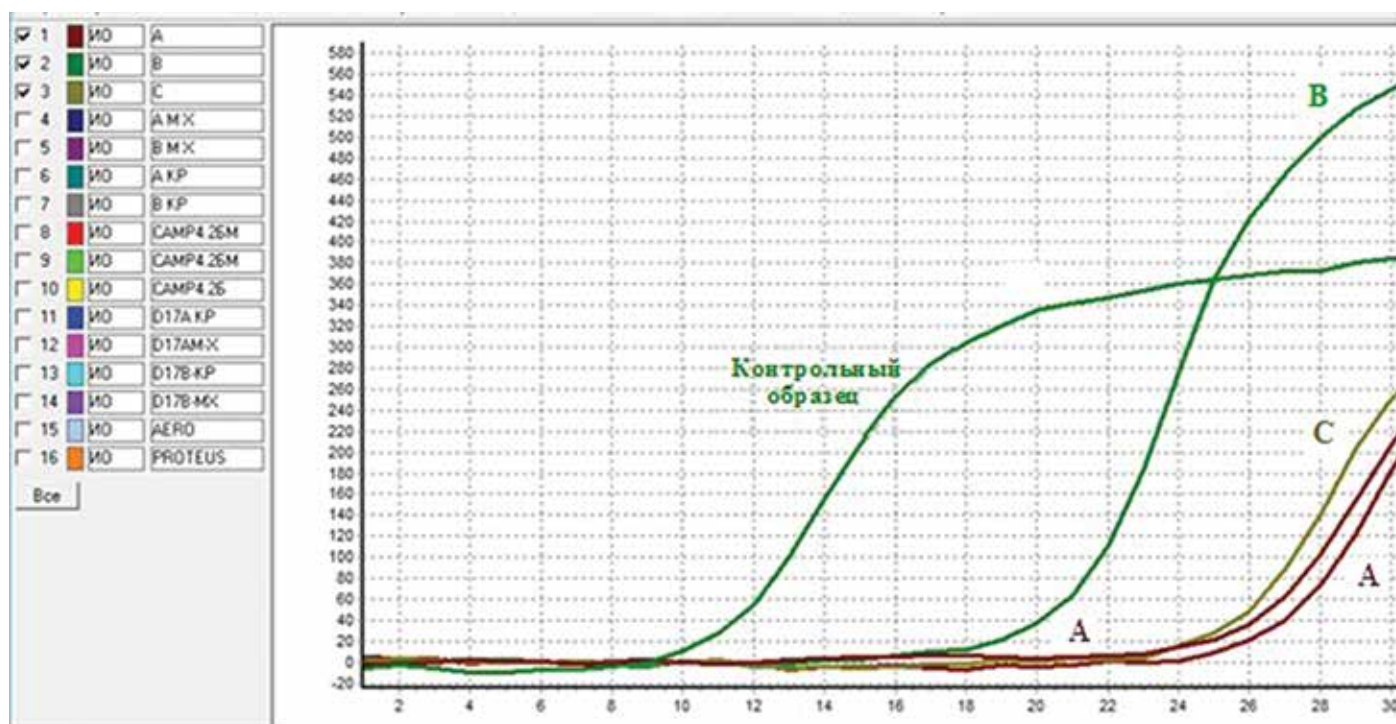


Рис. 14. Кривые амплификации *Campylobacter jejuni* (положительный контроль) и зашифрованных образцов «А», «В» и «С»

дом. В результате культивирования этих проб и последующей биохимической идентификации, бактерии рода *Campylobacter* были обнаружены только в пробе «В».

Результаты, полученные при проведении сравнительных испытаний разными методами, показали полную сходимость культурального и ПЦР метода, что позволяет использовать разработанную ПЦР тест-систему в лабораторной практике.

Выводы

В результате проведенных исследований были отработаны подходы к выбору генов-мишеней, обладающих разрешающей способностью в пределах рода *Campylobacter*. Были изучены характеристики

праймеров для определения кампилобактерий, в результате чего были подобраны родоспецифичные праймеры к бактериям рода *Campylobacter* на основе которых была разработана готовая к применению ПЦР тест-система для выявления *Campylobacter* spp. Была проведена оценка специфичности, точности и эффективности проводимой ПЦР. Разработанная тест-система была верифицирована в раунде международных сравнительных испытаний FEPAS. Установлено, что данная тест-система может быть использована для экспресс диагностики бактерий рода *Campylobacter* в мясе убойных животных. Полученные результаты подтверждены микробиологическим референс-методом.

Introduction

Progressing mutagenesis in pathogenic microorganisms of food origin is of serious pandemic hazard to modern world. Showing rapid variability, both at the genetic and phenotypic levels, pathogens become resistant to various factors including environmental ones. This leads to expansion of their distribution area.

A number of microorganisms are currently the most dangerous ones due to their wide distribution in nature, high survival and pathogenicity. Such microorganisms include the family of capnophilic epsilon-proteobacteria, *Campylobacterales*, in particular bacteria of *Campylobacter* and *Helicobacter* genera [1].

In addition, the World Health Organization identifies several most dangerous pathogenic microorganisms in terms of increasing resistance including bacteria of *Campylobacter* genus [2].

The WHO report «Global Look at Campylobacteriosis» noted that campylobacteriosis is an underestimated disease. The frequency of infection with pathogenic agent of this disease is growing rapidly in the population. The report identifies two species, *C. jejuni* and *C. coli*, as the most dangerous ones, despite the fact that twelve out of 16 *Campylobacter* species are considered pathogenic [3, 4].

Bacteria of *Campylobacter* genus are regarded worldwide as the most common food pathogens that cause campylobacteriosis (vibriosis) with the following pathogenesis: intestinal infections, enteritis, bacteremia, colitis, septic arthritis, hemolytic-uremic syndrome. In complicated cases, they may cause Reiter's syndrome or Guillain-Barre syndrome. In some cases, a lethal outcome is possible, mainly in the populations at risk because of weakened immunity. According to the WHO newsletter, usually the source of

infection and the cause of gastroenteritis is poultry meat that has undergone insufficient heat treatment [5].

In 2007, international Codex Alimentarius Commission (CAC) и Codex Committee on Food Hygiene stated the need for more careful study and control of *Salmonella* and *Campylobacter* genera bacteria [6, 7].

Studies of 148 food samples (lettuce, vegetables, raw milk, chicken meat, chicken raw by-products, turkey, quail, beef and washouts from various surfaces) carried out by «FIC of nutrition and biotechnology» detected their contamination and identified 50 strains of *Campylobacter* genus bacteria, most of which were represented by *C. jejuni* species. Most often, campylobacteria present in food due to contamination including contamination from the surface of the main and additional equipment. *Campylobacter jejuni* is the most pathogenic representative of the genus because of wide-range drug resistance to antimicrobial drugs including quinolones [8, 9].

Taking into account that birds (especially migratory birds) may be the carriers of campylobacteria, the dissemination of this pathogen among animals is rapid and difficult to control [4].

In connection with the zoonotic nature of the pathogen and widespread prevalence, the risk factor for campylobacteria infection persists at any meat processing plant, especially at poultry processing plants. It is also important to consider the resistance of these bacteria to environmental conditions. Campylobacteria can survive in a wide temperature range of 4 to 43°C. Because of this property, they are referred to as thermotolerant microorganisms. In wet natural objects (water, manure, soil, hay, etc.) at a temperature of 18–27°C, *Campylobacter* survive for more than a month. In products of animal origin at a temperature of 4°C, *Campylobacter* survive for 21 days, and at 20°C for at least 12 weeks. In infected tissues, campylobacteria survive up to a year. However, the bacteria of *Campylobacter* genus are susceptible to antibiotics and disinfectants, as well as to exposure to ultraviolet rays [10, 11].

According to the latest information, bacteria of *Campylobacter* genus are found not only in birds, but also in almost all warm-blooded animals: cattle, pigs, sheep, ostriches, domestic animals (cats, dogs). The path of transmission of campylobacteriosis causing pathogen is most often alimentary. Wild and migratory birds infect natural objects during defecation. Infection of other animals occurs when eating contaminated vegetation. Among livestock, the venereal transmission with the sperm of infected male is fairly widespread. Campylobacteria are distributed mainly in the intestines, reproductive organs and in lymphatic system [5, 12, 13, 14].

Considering the pathogenicity of campylobacteria and the nature of human disease, food microbiology uses different approaches to detect bacteria of *Campylobacter* genus in food and animal feed chain objects. First of all, these are the classical methods of microbiological practice, which are described in ISO 10272-1:2006 (en) Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for

detection and enumeration of *Campylobacter* spp. — Part 1: Detection method, with changes made in 2017. Soon, when determining campylobacteria, it will be necessary to use ISO 10272-1:2017 (en) Microbiology of the food chain — Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. — Part 1: Detection method [15], when it will be published. Quantitative and semi-quantitative determination is carried out according to ISO 10272-2:2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. — Part 2: Colony-count technique, ISO/TS10272-3:2010 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. — Part 3: Semi-quantitative method. In Russia, the detection and quantification of *Campylobacter* genus bacteria is carried out in accordance with three microbiological GOSTs: GOST ISO 10272-1-2013, GOST ISO/TS10272-2-2013 and GOST R55027-2012/ISO/TS10272-3:2010. In addition to traditional methods of campylobacteria detection, alternative (rapid) methods are used, for example real-time PCR analysis and immunochromatographic rapid tests.

Literature analysis showed that scientific interest was focused on determination and identification of campylobacteria in poultry. On average, these studies account for 98.3–99.5% of the total number of studies on campylobacteria among slaughter animals. And more than a third of them, in recent years, have been carried out using PCR (Figure 1). Studies of slaughter animal meat concerning the presence of campylobacteria almost were not carried out (with the exception of poultry). Most likely this was due to the low detection rate of *Campylobacter* spp. in red meat, which can be explained by different approaches to sampling and sample preparation in the studies of poultry and all other slaughter animals. Sampling and sample preparation of meat and meat products are carried out in accordance with ISO 6887-2 from deep layers and/or from surface. In this case, the collection of deep layers is carried

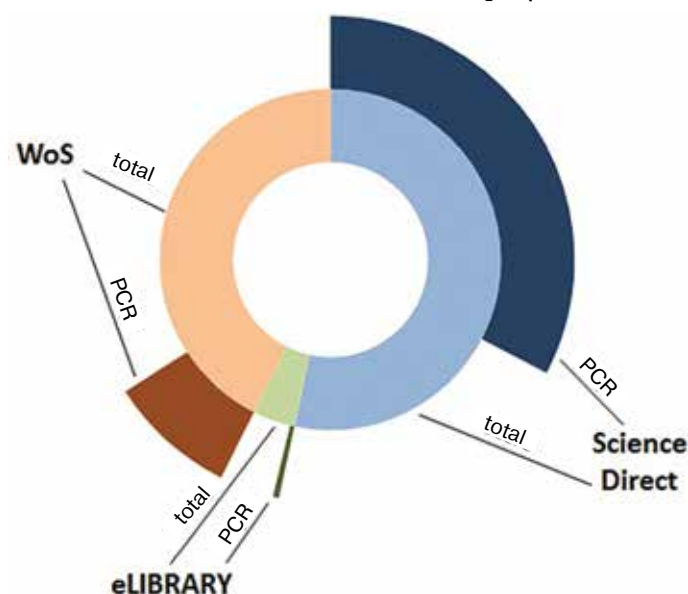


Figure 1. Analysis of publications concerning the problems of *Campylobacter* in international citation databases for the last 10 years

out after disinfection of the surface of investigation object. All the meat of slaughter animals intended for pathogenic microorganism testing is collected this way. As it was indicated above, the bacteria of *Campylobacter* genus are not distributed in the muscle tissues, and contaminate it during evisceration. Thus, meat sampling should be carried out from non-disinfected surface. However, poultry meat studies were mainly carried out using washouts, which contributed to the high detection of the target pathogen.

Despite the obvious need for stricter control of *Campylobacter* spp. at the enterprises in meat-processing industry, the determination of campylobacteria is difficult. This is due to their fastidious nature. They are capnophilic micro-aerobic microorganisms; for growth and development they require the creation of modified atmosphere with a high content of carbon dioxide and a reduced concentration of oxygen. In addition, specialized nutrient media, such as Preston broth or Bolton broth, in the pre-enrichment stage, and specialized agar medium (Mueller-Hinton agar, Coal agar) are needed for biomass gain. To identify *Campylobacter fetus*, media with de-buffered blood are needed, such as Colombian blood agar. It makes the identification of campylobacteria material-consuming, time-consuming and difficult to perform.

The most promising method for identifying campylobacteria is PCR. Currently, when controlling bacteria of *Campylobacter* genus by PCR, it is necessary to use the technique described in MUK 4.2.2872-11. The advantage of the technique is the absence of the need for selection and isolation of *Campylobacter* from a pool of microorganisms. The disadvantage of the technique is a lack of ready-to-use PCR test system for *Campylobacter* detection.

The purpose of this work was to develop a complete PCR test system for the detection of *Campylobacter* genus bacteria in food products.

Materials and methods

The study objects were pure culture strains of pathogenic microorganisms: *Campylobacter jejuni* subspecies *jejuni* 70.2T; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* ATCC14028; *Escherichia coli* ATCC 25922; *Proteus mirabilis* ATCC35659; *Aeromonas salmonicida*; poultry samples («A», «B», «C») presumably contaminated with bacteria of *Campylobacter* genus; products of strain amplification; isolated DNA of microbial strains.

The study used a microbiological method for the detection of *Campylobacter* genus bacteria according to ISO 10272:1. Primary enrichment was carried out in a selective liquid medium, Bolton broth (CM 0983, OXOID), in two stages. The first stage of incubation was carried out at a temperature of $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ for 4–6 hours and the second stage at a temperature of $(41.5 \pm 2)^\circ\text{C}$ during (44 ± 4) h. After that, inoculation into selective culture media (Preston agar and mCCD agar) and incubation at a temperature of $(41.5 \pm 2)^\circ\text{C}$ for 44 ± 4 h were carried out under the modified atmosphere conditions. To create modified atmosphere, commercial gas generators were used.

As a result of incubation, isolated colonies were obtained, which were identified using api commercial test systems (Biomerieux, France).

For PCR, the culture fluid obtained in the primary enrichment step was used to obtain biomass of the microorganism cells and subsequent isolation of DNA. For this, a 1.0 cm³ of culture liquid was transferred into sterile centrifuge tubes and centrifuged for 5 minutes at 6,500 rpm (Eppendorf). The resulting supernatant was removed to obtain biomass concentrate. Taking into account that the components of the nutrient medium may be present in the concentrate, the obtained biomass samples were subjected to washing. Therefore, a sterile saline solution was added to the decantate, suspended by shaking, and then re-centrifuged under the same conditions. DNA was isolated from the obtained concentrate after draining the washing saline solution.

For PCR, typical colonies were also selected from selective agar media and a suspension of microorganisms with a given titer in a sterile saline solution were prepared. To determine the titer of microorganisms, the method of comparison with McFarland turbidity standard No. 1 (Biomerieux, France, equivalent to 3×10^8 bacterial cells per 1 cm³ of suspension) was used. The resulting suspension was centrifuged to obtain biomass concentrate. DNA was isolated from the resulting concentrate.

According to a literature search, the bacteria of *Campylobacter* genus are able to interact in accordance with commensalism principle or are in consortium of intestinal microbiome with other pathogenic microorganisms. In this connection, during the analysis of *Campylobacter* genome, a comparison was made with the bacteria of *Escherichia* and *Salmonella* genera. To carry out PCR for these microorganisms, the museum cultures were re-cultured on a solid nutrient medium, Trypton-soya agar (TSA), and cell suspension with a given titer in saline solution was prepared by the method similar to that used to prepare a suspension of *Campylobacter* cells.

For DNA isolation, 50 µl of cell suspension was prepared. DNA extraction was performed by magnetic particles method on MagNA Pure LC2.0 Instrument (Roche, Switzerland) using MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Roche, Switzerland).

Genome analysis and matching of the design of complementary primers to *Campylobacter* were performed using Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) and Oligo Analyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) software.

To obtain DNA fragments, universal primers (Table 1) and gene-specific primers (Table 2) to 16S rDNA gene were used.

Selected gene-specific primers to the 16S rDNA gene of *Campylobacter* genus bacteria were used for real-time PCR. The conditions and modes of PCR reaction are given in Table 3. The melting point was determined in silico using interactive program uMELTSM (<https://dna.utah.edu/umelt/um.php>).

Table 1. 16S rDNA primers used to obtain DNA fragments of *Campylobacter* genus bacteria

Forward primer	TACGGGAGGCAGCAG	Plus	15	2	16	54.37	66.67	3.00	2.00
Reverse primer	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT	Minus	20	566	547	54.11	40.00	4.00	0.00
Product length	565								

Table 2. Gene-specific primers to 16S rDNA gene of *Campylobacter* genus bacteria used for real-time PCR:

Forward primer	GTTAAGTCCCGCAACGAGC	Plus	19	463	481	59.21	57.89	4.00	2.00
Reverse primer	GGCTGATCTACGATTACTAGCGA	Minus	23	735	713	59.56	47.83	4.00	2.00
Product length	273								

The purity of the obtained PCR products (amplicons) was checked by electrophoresis in a 2 % agarose gel using TBE buffer (Thermo Scientific, USA). To stain the PCR products, SYBRGreen I stain (Sileks, Russia) was used. The volume of the sample added to each of the three gel wells was 15 µl. For the induction of fluorescent light from the stain, ETX-F26 transilluminator (Vilber Lourmat, France) was used.

For the primary purification of DNA fragments, Clean-up Standard kit (Eurogen, Russia) was used. For this, 200 mg or less of agarose gel was applied to the column and purification was carried out according to the manufacturer's recommendations and kit instructions, with some modifications. In this study, the centrifugation time was increased at all stages from 30 to 60 seconds; the eluting solution was preheated to 55°C; after the initial addition of the elution buffer, the samples were aged for 5 minutes. As a result, three samples of equal volume were obtained, which were pooled. The total volume of the pooled sample was 600 µl.

The second stage of column purification was carried out using MinElute Purification Kit (Qiagen, USA) according to the protocol. 600 µl of the sample obtained after the initial purification was added to the column. The volume of the eluting buffer added to the membrane in the second purification step was increased to 15 µl.

The concentration of purified PCR products was determined by photometric method using Qubit 3.0 photometer (Thermo Scientific, USA) according to the Qubit dsDNA HS Assay Kits protocol (Thermo Scientific, USA).

Results and discussion

To genotype the control strain, *Campylobacter jejuni* subspecies *jejuni* 70.2T, its DNA was isolated and PCR reaction was carried out with the selected universal primers to 16S prokaryotic RNA gene. The convergence of the selected forward and reverse primers is shown in Figure 2 and Figure 3.

Data presented in Figure 2 and Figure 3 indicate that the forward primer is 100 % convergent with *Campylobacter*, and the reverse primer has a convergence of 95 %. Due to the fact that the reverse primer is not fully convergent with *Campylobacter*, a systemic mismatch of the divergence site was analyzed. The results are shown in Figure 4.

The location of the mismatch in the 5' region of primer allowed the use of universal primers to obtain amplification products for sequencing.

Table 3. Conditions and modes of PCR reaction

When PCR fragments are generated for further sequencing:			
Composition of the reaction mixture:		PCR conditions	
Q5 PCR buffer × 2.0	12,5 µl	98	120
Water	7 µl	Denaturation	
Prmix	3 µl	54	30
DNA	2 µl	72	20
Eva-green stain	0,5 µl	98	15
30 cycles			
When performing real-time PCR:			
Composition of the reaction mixture:		PCR conditions	
PC × 2.5	10 µl	95	400
Water	15 µl	60	40
Prmix	3 µl	95	15
DNA	2 µl	40 cycles	
Eva-green stain	0,4 µl		
Taq-polymerase	0,4 µl		

As a result of sequencing carried out together with ZAO «Eurogen» of purified DNA fragments of *Campylobacter jejuni* subspecies *jejuni* 70.2T strain, its nucleotide sequence was established and the species specificity of the strain under investigation was confirmed. This allowed to use the strain as a positive control in the development of gene-specific *Campylobacter* spp. PCR test system.

When selecting gene-specific primers in NCBI database, a more conservative 16S rDNA ITS sequence was selected, because the constitutive genes of *Campylobacter* (house-keeping genes) possess high species specificity. The results of the convergence study of the selected gene-specific forward and reverse primers to various species of *Campylobacter* genus bacteria are presented in Figure 5 and Figure 6.

From the data presented, it is clear that the selected gene-specific primers are 100 % convergent with the genome of *Campylobacter* genus bacteria.

To calculate the sensitivity and efficiency of PCR reaction with the gene-specific primers, PCR was performed using a series of ten-fold dilutions of DNA. The results of the primer sensitivity are presented in Figure 7.

Based on the analysis of the data presented in Figure 7, the fifth DNA dilution was taken as the lower limit of detection for PCR method, equivalent to 1×10^4 bacterial cells in 1 cm³ of suspension.

The results obtained in real-time PCR correlate with the calculated data and confirm the 100 % specificity of the selected primers for *Campylobacter* genus bacteria. The efficiency of PCR is not less than 95 % (Figure 8).

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Campylobacter sputorum strain RM8705, complete genome	30.2	90.7	100%	0.57	100%	CP019685.1
Campylobacter sputorum bv. paraureolyticus LMG 11764 strain LMG 17589, complete genome	30.2	90.7	100%	0.57	100%	CP019684.1
Campylobacter sputorum bv. faecalis CCUG 20703, complete genome	30.2	90.7	100%	0.57	100%	CP019683.1
Campylobacter sputorum bv. sputorum RM3237, complete genome	30.2	90.7	100%	0.57	100%	CP019682.1
Campylobacter jejuni strain FORC_046, complete genome	30.2	112	100%	0.57	100%	CP017229.1
Campylobacter jejuni strain 11643 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	30.2	30.2	100%	0.57	100%	MF372576.1
Campylobacter jejuni strain 11657 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	30.2	30.2	100%	0.57	100%	MF372575.1
Campylobacter jejuni strain 11024 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	30.2	30.2	100%	0.57	100%	MF372574.1
Campylobacter jejuni strain 11044 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	30.2	30.2	100%	0.57	100%	MF372573.1
Campylobacter jejuni strain 13775 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	30.2	30.2	100%	0.57	100%	MF372572.1
Campylobacter jejuni subsp. jejuni strain FDAARGOS_265, complete genome	30.2	90.7	100%	0.57	100%	CP022079.1
Campylobacter jejuni subsp. jejuni strain FDAARGOS_262, complete genome	30.2	90.7	100%	0.57	100%	CP022076.1
Campylobacter jejuni subsp. jejuni strain ATCC 35025, complete genome	30.2	114	100%	0.57	100%	CP020045.1
Campylobacter jejuni strain NCTC12852, complete genome	30.2	114	100%	0.57	100%	CP019965.1
Campylobacter coli strain aerotolerant OR12, complete genome	30.2	90.7	100%	0.57	100%	CP019977.1
Campylobacter cinnamiediorum subsp. cinnamiediorum strain RM17262, complete genome	30.2	111	100%	0.57	100%	CP012548.1

Figure 2. Estimation of the specificity of the forward primer for *Campylobacter* sequencing

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Campylobacter jejuni strain 11643 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.001	100%	MF372576.1
Campylobacter jejuni strain 13775 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.001	100%	MF372572.1
Uncultured Campylobacter sp. clone 4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.001	100%	KC535089.1
Uncultured Campylobacter sp. isolate DGGF gel band S9J4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.001	100%	EF531939.1
Campylobacter coli strain BG2108, complete genome	32.2	271	100%	0.36	95%	CP017878.1
Campylobacter coli strain ZV1224, complete genome	32.2	328	100%	0.36	95%	CP017875.1
Campylobacter coli strain WA333, complete genome	32.2	303	100%	0.36	95%	CP017873.1
Campylobacter coli strain BP3183, complete genome	32.2	319	100%	0.36	95%	CP017871.1
Campylobacter coli strain YF2105, complete genome	32.2	271	100%	0.36	95%	CP017865.1
Campylobacter jejuni strain CJ677CC078, complete genome	32.2	344	100%	0.36	95%	CP010507.1
Campylobacter jejuni strain CJ677CC538, complete genome	32.2	344	100%	0.36	95%	CP010495.1
Campylobacter coli strain OR12, complete genome	32.2	372	100%	0.36	95%	CP013733.1
Campylobacter lari strain RM16712, complete genome	32.2	433	100%	0.36	95%	CP007779.1
Campylobacter lari strain RM16701, complete genome	32.2	297	100%	0.36	95%	CP007777.1
Campylobacter lari strain NCTC 11845, complete genome	32.2	459	100%	0.36	95%	CP007775.1
Campylobacter volutis LMG 24379, complete genome	32.2	390	100%	0.36	95%	CP007774.1
Campylobacter subantarcticus LMG 24377, complete genome	32.2	483	100%	0.36	95%	CP007773.1
Campylobacter subantarcticus LMG 24374, complete genome	32.2	465	100%	0.36	95%	CP007772.1
Campylobacter lari subsp. concheus LMG 11760, complete genome	32.2	370	100%	0.36	95%	CP007771.1

Figure 3. Estimation of the specificity of the reverse primer for *Campylobacter* sequencing

Campylobacter coli strain BG2108, complete genome

Sequence ID: [CP017878.1](#) Length: 1695638 Number of Matches: 11

Range	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1114526 to 1114545	32.2 bits (16)	0.36	19/20 (95%)	0/20 (0%)	Plus/Plus
Query 1	COSTCAATTCCTTTGAGTTT 20				
Subject 1114526	COSTCAATTCCTTTGAGTTT 1114545				

Figure 4. System mismatch of the universal reverse primer

To determine unique character of PCR reaction, a series of comparative experiments was performed using microorganisms that may be detected in samples along with

Campylobacter (Figure 9). The most common are the associates of campylobacteria microbiome with the bacteria of *Salmonella* and *Escherichia* genera. In this connection, it was interesting to conduct a PCR study with the selected gene-specific primers for *Salmonella* and *Escherichia*.

The analysis of the data obtained from PCR reaction (Figure 9) showed that the selected primers give a positive reaction to the bacteria of *Salmonella* and *Escherichia* genera. Therefore, the specificity of the reaction when using these primers was not confirmed.

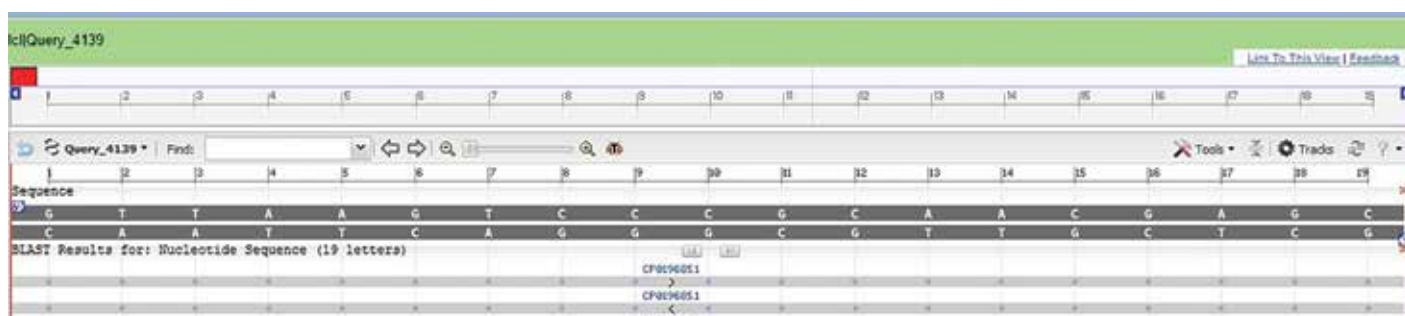


Figure 5. Convergence of the gene-specific forward primer to the genome of *Campylobacter* genus bacteria

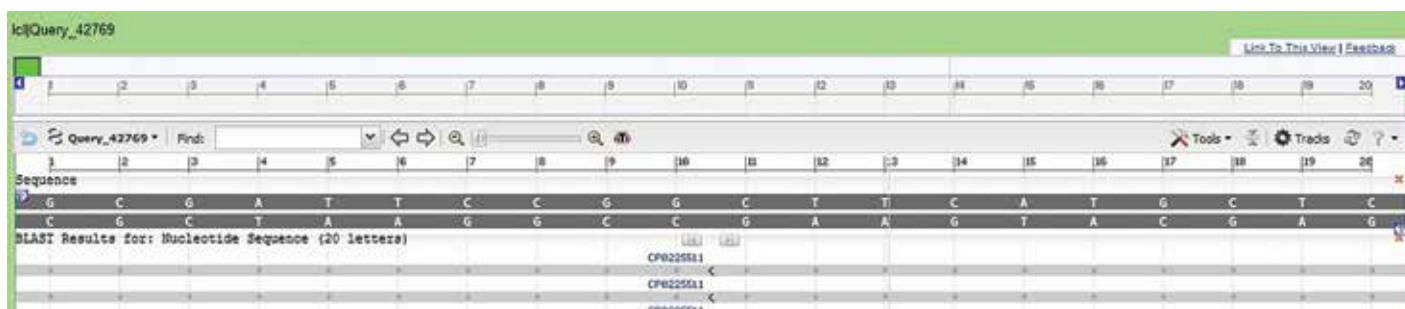


Figure 6. Convergence of the gene-specific reverse primer to the genome of *Campylobacter* genus bacteria

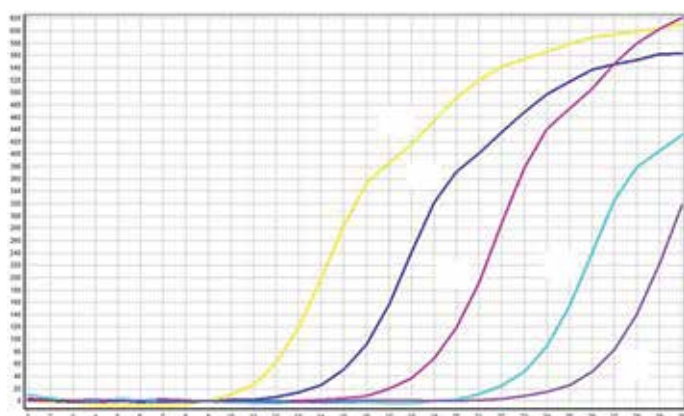


Figure 7. Sensitivity results of the gene-specific primers for *Campylobacter*

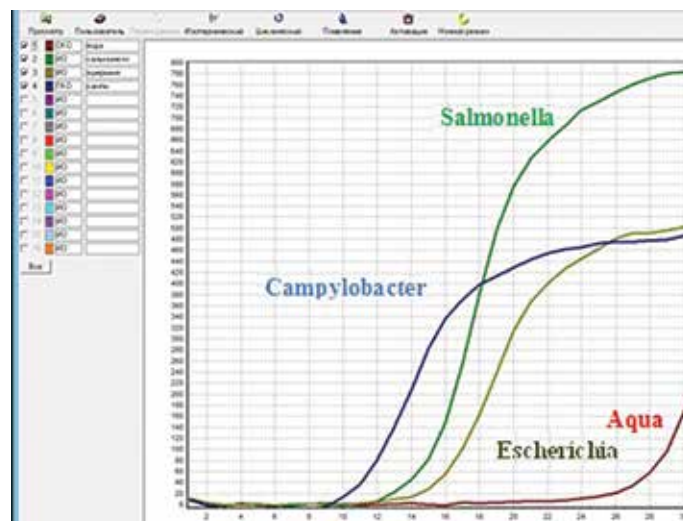


Figure 9. Results of PCR study using the universal gene-specific primers

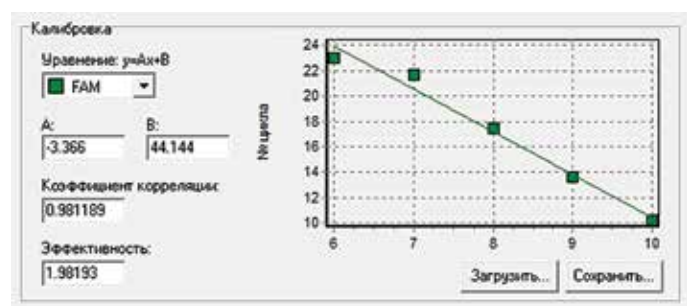


Figure 8. The curve of the calculated efficiency of PCR reaction

For the selection of specific primers, *Campylobacter* 16S DNA regions was aligned with homologous regions of 16S DNA from the bacteria of *Salmonella*, *Escherichia* and *Aeromonas* genera (Figure 10).

As a result of the alignment, it was found that the reverse primer has only two mismatches for homologous regions of bacterial DNA located in the 5' region of the primer. This sequence does not have proper specificity, so when it is used, the test system will give a false positive reaction.

To avoid false positive reactions, it was decided to move the complementary primer-binding region of the 3' region by 16 base pairs of nucleotides from the position 1338 to the position 1322 (Figure 11).

From the data presented, it is clear that the new reverse primer has 3 mismatches for homologous DNA regions of *Salmonella*, *Escherichia* and *Aeromonas* bacteria located in the 3' primer region responsible for the specific annealing.

To confirm the specificity of PCR reaction with the new selected primers, after homologous DNA regions were aligned, PCR reaction was performed with the bacteria of *Salmonella*, *Escherichia* and *Campylobacter* genera (Figure 12).

It is noted that the new selected primers are specific for the bacteria of *Salmonella* and *Escherichia* genera. The obtained results of the amplification allow to state that the use of the new selected primers excludes a diagnostic

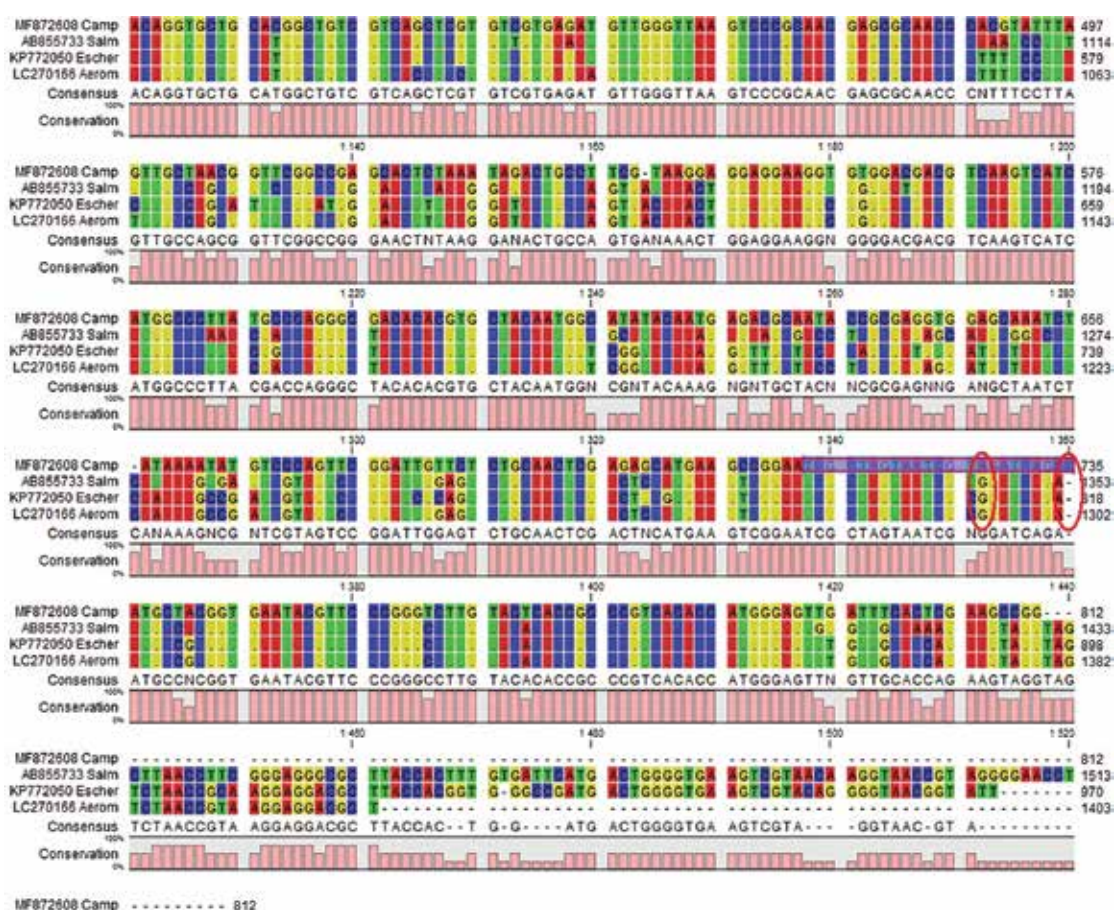


Figure 10. Alignment of homologous DNA regions from the bacteria of *Salmonella*, *Escherichia*, *Aeromonas* and *Campylobacter* genera containing the universal reverse primer annealing site

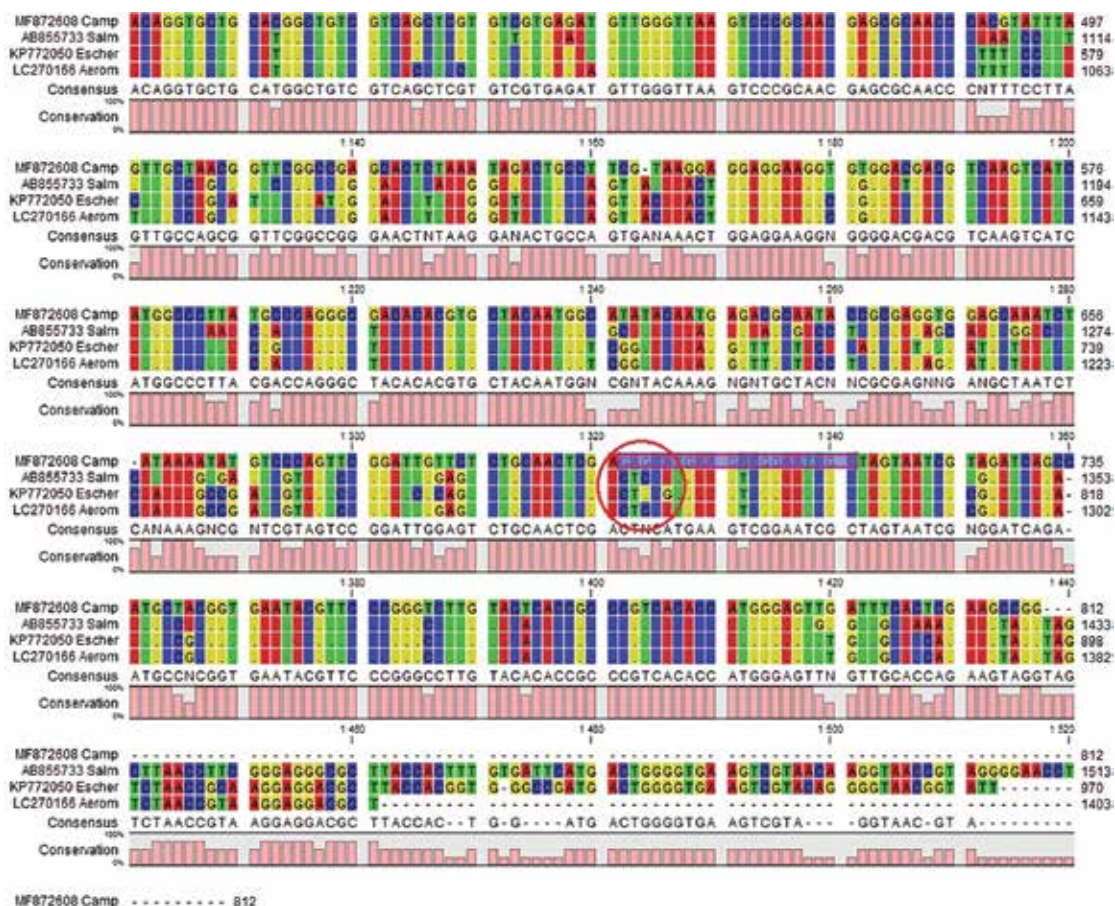


Figure 11. Alignment of homologous DNA regions from the bacteria of *Salmonella*, *Escherichia*, *Aeromonas* and *Campylobacter* genera containing the reverse primer annealing site

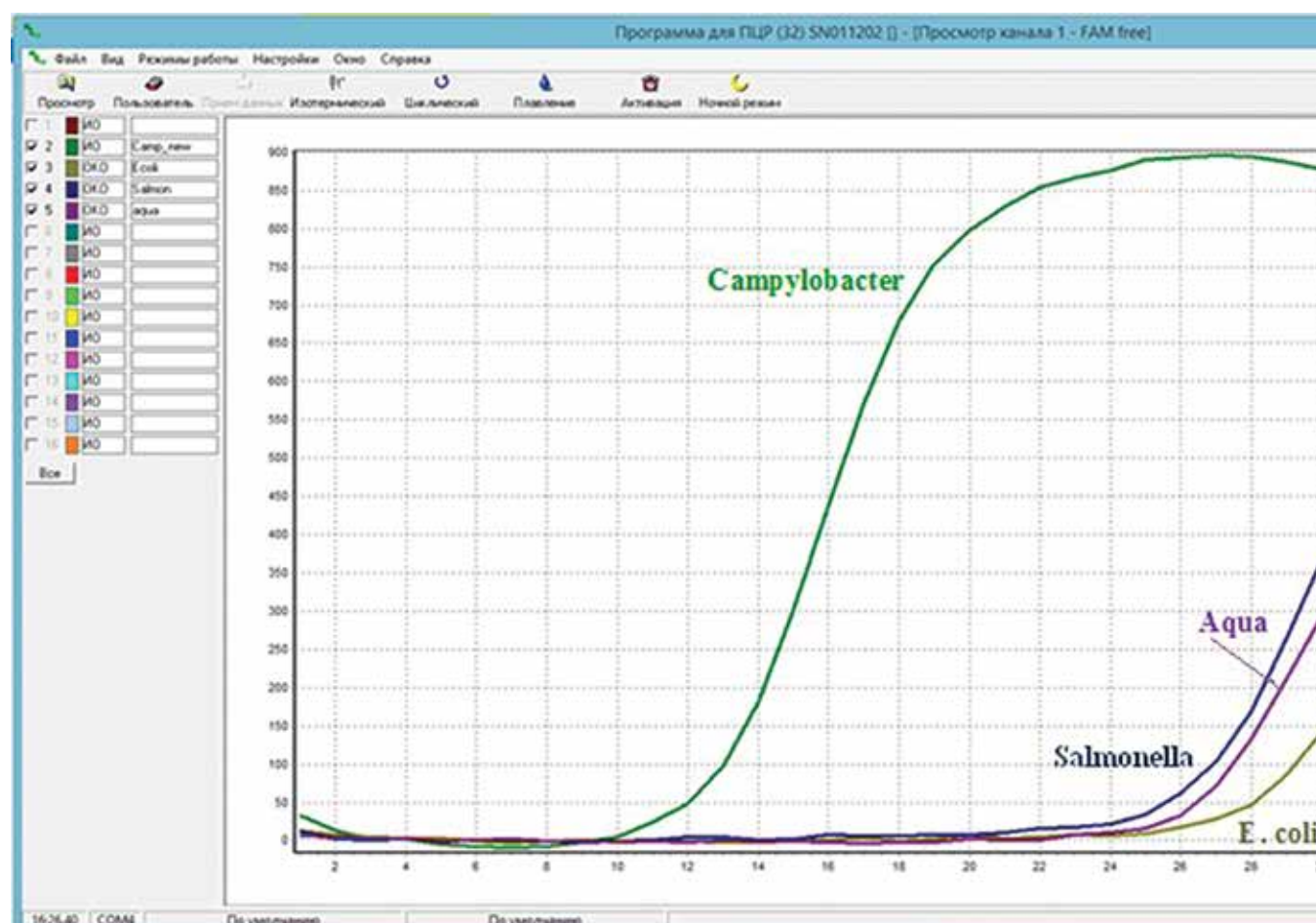


Figure 12. Amplification results for *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* and *Escherichia coli*

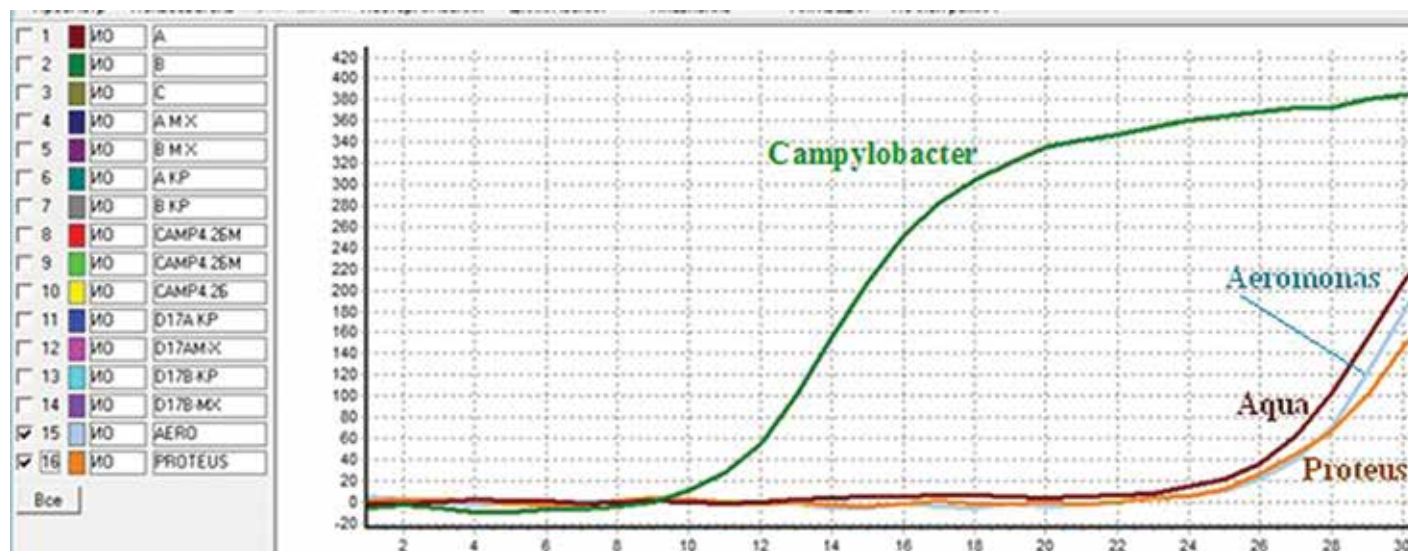


Figure 13. Amplification results for *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas salmonicida* and *Proteus mirabilis*

error in the differentiation of *Campylobacter* genus from the bacteria of *Salmonella* and *Escherichia* genera.

Taking into account that *Campylobacter* may occur in a mixed culture with *Proteus* and *Aeromonas* genera, a comparative intergeneric diagnosis was carried out by performing PCR with the selected primers (Figure 13).

The data presented in the figure prove that the selected primers have high specificity for the bacteria of *Aeromonas* and *Proteus* genera.

To evaluate the diagnostic capabilities of the developed PCR test system, a series of comparative test with a traditional microbiological method for *Campylobacter* genus bacteria detection were carried out.

As it is seen from the PCR study data presented in Figure 14, only sample «B» gave a positive amplification reaction, which indicates the presence of *Campylobacter* genus bacteria. Samples «A» and «C» gave a negative reaction during PCR, which confirms the absence of *Campylobacter* spp.

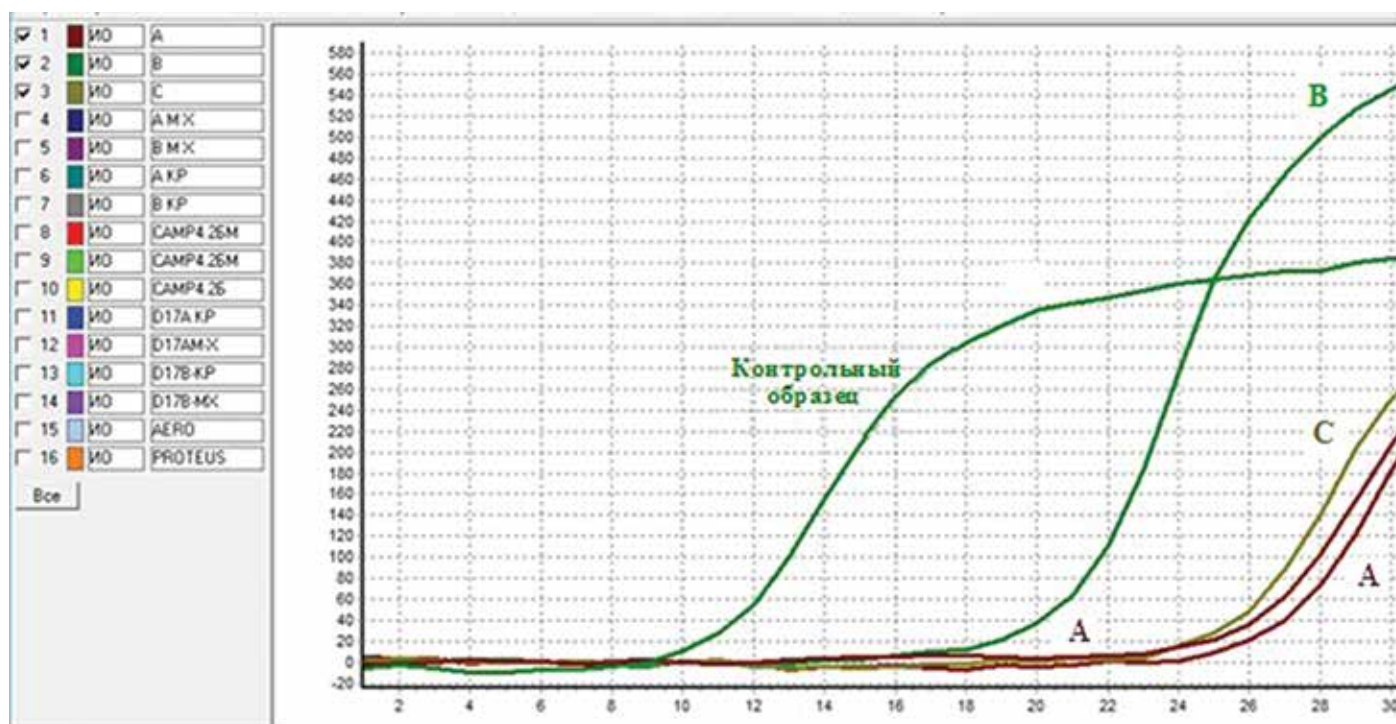


Figure 14. Amplification curves for *Campylobacter jejuni* (positive control) and coded samples «A», «B», and «C»

In parallel with PCR analysis, samples «A», «B», and «C» were analyzed by the cultural method. As a result of incubation of these samples and subsequent biochemical identification, bacteria of *Campylobacter* genus were detected only in sample «B».

The results obtained during the comparative tests by different methods showed the complete convergence of the cultural method and PCR, which makes it possible to use the developed PCR test system in laboratory practice.

Conclusions

As a result of the conducted studies, approaches to the selection of target genes within the *Campylobacter* genus were developed. The characteristics of primers for the determination of campylobacteria were studied, which resulted in the selection of gene-specific primers to bacteria of *Campylobacter* genus, on the basis of which a ready-to-use PCR test system for the detection of *Campylobacter* spp. was developed. An assessment of PCR specificity, accuracy and effectiveness was made. The developed test-system was verified in a cycle of FEPAS international comparative tests. It is established that this test system may be used for the rapid detection of *Campylobacter* genus bacteria in meat of slaughter animals. The results obtained are confirmed by microbiological reference method.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Campbell, B.J., Engel, A.S., Porter, M.L., Takai, K. (2006). The versatile ϵ -proteobacteria: Key players in sulphidic habitats. *Nature Reviews Microbiology*, 4(6), 458–468.
2. ВОЗ публикует список бактерий, для борьбы с которыми срочно требуется создание новых антибиотиков. Центр СМИ ВОЗ. [Интернет ресурс: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/ru/> Дата обращения 29.10.2017].
3. The global view of Campylobacteriosis. Report of an expert consultation, (2012). Utrecht, Netherlands 9–11 July. — 136 p.
4. Altekruze, S.F., Stern, N.J., Fields, P.I., Swerdlow, D.L. (1999). *Campylobacter jejuni* — an emerging foodborne pathogen. *Emerging Infectious Disease*, 5(1), 28–35.
5. Кампилобактериоз. Информационный бюллетень ВОЗ. [Интернет ресурс: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/ru/>. Дата обращения 29.10.2017].
6. Microbiological Risk Assessment Series. Salmonella and Campylobacter in chicken meat. (2009). Meeting report FAO and WHO.
7. Codex Alimentarius CAC/GL 78–2011, (2011) Guidelines for the Control of Campylobacter and Salmonella in Chicken Meat.

8. Ефимочкина, Н.Р., Быкова, И.Б., Стеценко, В.В., Минаева, Л.П., Пичугина, Т.В., Маркова, Ю.М., Короткевич, Ю.В., Козак, С.С., Шевелева, С.А. (2016). Изучение характера контаминации и уровней содержания бактерий рода *Campylobacter* в отдельных видах пищевой продукции. *Вопросы питания*, 85(5), 52–59.
9. Little, C.L., Richardson, J.F., Owen, R.J., de Pinna, E., Threlfall, E.J. (2008). *Campylobacter* and *Salmonella* in raw red meats in the United Kingdom: Prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern, 2003–2005. *Food microbiology*, 25(3), 538–543.
10. Бессарабов Б.Ф., Вашутин А.А., Воронин Е.С. и др. Под ред. А. А. Сидорчука (2007). Инфекционные болезни животных. М., КолосС.—671 с. ISBN 978–5–9532–0301–2
11. Dikeman, M., Devine, C. (2014). *Encyclopedia of Meat Sciences*. Second Edition. Cambridge, Academic Press. — 1525 p. ISBN: 978–012384731–7; 978–012384734–8
12. Bojanić, K., Midwinter, A.C. Marshall, J.C., Rogers, L.E., Biggs, P.J., Acke, E. (2017) Isolation of campylobacter spp. from client-owned dogs and cats, and retail raw meat pet food in the Manawatu, New Zealand. *Zoonoses Public Health*, 64(6). 438–449.

13. Groff, A.C.M., Kirinus, J.K., Sá e Silva, M., Machado, G., Costa, M.M., Vargas, A.P.C. (2010). Polymerase chain reaction for the diagnosis of bovine genital campylobacteriosis. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30(12), 1031–1035.
14. Chaban, B., Chu, S., Hendrick, S., Waldner, C., Hill, J.E. (2012). Evaluation of a *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* real-

time quantitative polymerase chain reaction for direct analysis of bovine preputial samples. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 76(3), 166–173.

15. Он-лайн библиотека стандартов ISO [Интернет ресурс: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:10272:-1:ed-2:v1:en> Дата обращения 20.10.017].

REFERENCES

1. Campbell, B.J., Engel, A.S., Porter, M.L., Takai, K. (2006). The versatile ϵ -proteobacteria: Key players in sulphidic habitats. *Nature Reviews Microbiology*, 4(6), 458–468.
2. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Media center of WHO. [Electronic resource: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/ru/> Access date 29.10.2017].
3. The global view of Campylobacteriosis. Report of an expert consultation, (2012). Utrecht, Netherlands 9–11 July.—136 p.
4. Altekruze, S.F., Stern, N.J., Fields, P.I., Swerdlow, D.L. (1999). *Campylobacter jejuni* — an emerging foodborne pathogen. *Emerging Infectious Disease*, 5(1), 28–35.
5. Campylobacter. Fact sheet. WHO. [Electronic resource: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/ru/>. Access date 29.10.2017].
6. Microbiological Risk Assessment Series. Salmonella and Campylobacter in chicken meat. (2009). Meeting report FAO and WHO.
7. Codex Alimentarius CAC/GL 78–2011, (2011) Guidelines for the Control of Campylobacter and Salmonella in Chicken Meat.
8. Efimochkina, N.R., Bykova, I.B., Stetsenko V.V., Minaeva L.P., Pichugina T.V., Markova Yu.M., Korotkevich Yu.V., Kozak S.S., Sheveleva S.A. (2016). Study of the nature of contamination and levels of bacteria of the genus *Campylobacter* in certain types of food products. *Voprosy pitaniya*, 85(5), 52–59. (in Russian).
9. Little, C.L., Richardson, J.F., Owen, R.J., de Pinna, E., Threlfall, E.J. (2008). Campylobacter and Salmonella in raw red meats in the United Kingdom: Prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern, 2003–2005. *Food microbiology*, 25(3), 538–543.
10. Bessarabov B.F., Vashutin A.A., Voronin Ye.S. and other. Infectious diseases of animals. Moscow.: Kolos.—671 p. (in Russian).
11. Dikeman, M., Devine, C. (2014). Encyclopedia of Meat Sciences. Second Edition. Cambridge: Academic Press. — 1525 p. ISBN: 978-012384731-7; 978-012384734-8
12. Bojanić, K., Midwinter, A.C. Marshall, J.C., Rogers, L.E., Biggs, P.J., Acke, E. (2017) Isolation of campylobacter spp. from client-owned dogs and cats, and retail raw meat pet food in the Manawatu, New Zealand. *Zoonoses Public Health*, 64(6). 438–449.
13. Groff, A.C.M., Kirinus, J.K., Sá e Silva, M., Machado, G., Costa, M.M., Vargas, A.P.C. (2010). Polymerase chain reaction for the diagnosis of bovine genital campylobacteriosis. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30(12), 1031–1035
14. Chaban, B., Chu, S., Hendrick, S., Waldner, C., Hill, J.E. (2012). Evaluation of a *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* real-time quantitative polymerase chain reaction for direct analysis of bovine preputial samples. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 76(3), 166–173.
15. Online Browsing Platform ISO [Electronic resource: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:10272:-1:ed-2:v1:en> Access date 20.10.017].

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, г. Москва, ул. Талалихина, 26
Тел.: +7-495-676-60-11
E-mail: d.bataeva@fncps.ru
*автор для контактов

Минаев Михаил Юрьевич — кандидат технических наук, руководитель ПЦР направления, 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

Юшина Юлия Константиновна — кандидат технических наук, руководитель лаборатории «Гигиена производства и микробиология», Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН
10931, г. Москва, ул. Талалихина, 26
Тел. +7-495-676-91-26
E-mail: yu.yushina@fncps.ru

Соколова Ольга Вячеславовна — кандидат технических наук, 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: o.sokolova@fncps.ru

Зайко Елена Викторовна — 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: e.zaiko@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 и корректировала после подачи в редакцию

Минаев М.Ю. проводил подбор праймеров для постановки ПЦР, анализировал полученные данные

Юшина Ю.К. анализировала полученные данные, проводила описательную часть работы

Соколова О.В. проводила обзор и анализ литературы, выполняла описательную часть

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

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.11.2017

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. Gorbato 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

Mikhail Yu. Minaev — candidate of technical sciences, a head of the Molecular diagnostic division, leading scientific worker of the Laboratory «Hygiene of production and microbiology» V.M. Gorbato 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

Yulia K. Yushina — candidate of technical sciences, docent, Head of the Laboratory «Hygiene of production and microbiology», V.M. Gorbato Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences
109316, Talalikhina str. 26,
Tel.: +7-495-676-91-26
E-mail: yu.yushina@fncps.ru

Olga V. Sokolova — candidate of technical sciences, junior researcher worker of the Laboratory «Hygiene of production and microbiology» V.M. Gorbato 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. Gorbato 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

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.

Mikhail Yu. Minaev conducted the selection of primers for the production of PCR, analyzed the data obtained

Yulia K. Yushina analyzed the obtained data, conducted descriptive part of the work

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 and PCR 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 15.11.2017

ФОРМИРОВАНИЕ НАУЧНОГО БАЗИСА МЕТА-ДАННЫХ, СВЯЗАННЫХ С ОЦЕНКАМИ «ОНКО-» РИСКОВ, АССОЦИИРОВАННЫМИ С МЯСНОЙ ПРОДУКЦИЕЙ

Вострикова Н.Л.*, Кузнецова О.А., Куликовский А.В., Минаев М.Ю

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

Ключевые слова: мета-данные, онко-риски, канцерогены.

Аннотация

Настоящий обзор посвящен формированию интегрированного научного базиса, основанном на данных различных статистических публикаций (мета-данных), которые связывают с «онко-» рисками, ассоциированными с мясной продукцией. В октябре 2015 года Всемирная организация здравоохранения опубликовала отчет, в котором красное мясо назвали «вероятным канцерогеном для человека». Помимо этого, эксперты ВОЗ пришли к заключению о канцерогенности переработанного мяса (подвергшегося обработке путем копчения, соления, ферментации и других процессов, продлевающих хранение). Однако в глобальном масштабе нет стандартизованного способа обзора огромного объема исследований механизмов, с помощью которых факторы образа жизни могут вызывать рак. Тем не менее, в настоящее время начата работа по разработке и тестированию новой методологии для проведения систематических обзоров механистических исследований, связанных с диетой, питанием, физической активностью, развитием и прогрессированием различных видов рака.

Актуальность изучения исследований в данном направлении позволит сформировать базис мета-данных, связанный с «онко-» рисками, ассоциированными с мясной продукцией, определение основных и сопутствующих факторов воздействия на онко-риски. Полученная информация позволит создать научный задел для проведения дальнейших работ по изучению влияния компонентов попадающих, либо образующихся в мясной продукции, ассоциированных с онко-рисками.

Review paper

FORMATION OF THE SCIENTIFIC BASIS OF META-DATA ASSOCIATED WITH ESTIMATES OF «ONCO-» RISKS LINKED TO MEAT PRODUCTS

Natal'ya L. Vostrikova*, Oksana A. Kuznetsova, Andrey V. Kulikovskii, Mikhail Yu. Minaev

V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences

Key words: meta data, cancer risks, carcinogens.

Abstract

This review is devoted to formation of the integrated scientific foundation based on the data of different statistical publications (meta data) that are linked to «onco-» risks associated with meat products. In October 2015, World Health Organization (WHO) published a report, in which red meat was classified as probably carcinogenic to humans. In addition, the WHO experts made a conclusion about carcinogenicity of processed meat (meat that has been processed by smoking, salting, fermentation or other processes to extend storage). However, globally, there is no standardized method for reviewing the vast amount of studies on the mechanisms, by which lifestyle factors can cause cancer. At present, the work was begun on the development and testing of new methodology for performing systematic reviews of mechanistic investigations associated with a diet, nutrition, physical activity, and the development and progression of different types of cancer.

A topical analysis of research in this direction will allow formation of basic meta data associated with «onco-» risks, linked to meat products, detection of basic and accompanying factors influencing «onco-» risks. The obtained information will enable the creation of a scientific reserve for further work on studying an effect of components entering into or developing in meat products associated with «onco-» risks.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Вострикова Н.Л., Кузнецова О.А., Куликовский А.В., Минаев М.Ю. Формирование научного базиса мета-данных, связанных с оценками «онко-» рисков, ассоциированными с мясной продукцией. Теория и практика переработки мяса. 2017;2(4):96–113. DOI:10.21323/2414-438X-2017-2-4-96-113

FOR CITATION: Vostrikova N.L., Kuznetsova O.A., Kulikovskii A.V., Minaev M. Yu. Formation of the scientific basis of meta-data associated with estimates of «onco-» risks linked to meat products. Theory and practice of meat processing. 2017;2(4):96–113. (In Russ.) DOI:10.21323/2414-438X-2017-2-4-96-113

Введение

В настоящее время существует растущий рынок пищевых продуктов, обладающих реальными и ожидаемыми полезными для здоровья свойствами. Развитие этого рынка, стимулируемое мнением потребителей, что «натуральное значит безопасное», приводит к увеличению использования растительных продуктов в качестве биоактивных ингредиентов в функциональном питании, а также в качестве пищевых добавок и специй.

Красное мясо — признанный лидер гастрономических симпатий по всему свету. Однако свойства этого продукта и его влияние на наш организм вызывают жаркие споры. Особенно актуальным является изучение данных аспектов в рамках Стратегии научно-технологического развития РФ, направленные повышение качества жизни населения, обеспечение безопасности страны и укрепление позиции России в глобальном рейтинге уровня жизни за счет создания на основе передовых научных исследований востребованных продуктов, товаров и услуг.

Но прежде выясним, что относится к красному мясу. Это в первую очередь говядина, свинина, баранина и конина. Мясо кролика, которое «краснеет» с возрастом, также можно добавить в этот список. Характерный цвет всем им придает миоглобин-особый белок, содержащийся в мышечных тканях. Кстати, красное мясо птицы — кур, гусей, индеек, цесарок — тоже относится к данному типу. Белым считают лишь диетическую грудку, тогда как остальные части тушки являются красным мясом.

Сторонники красного мяса, то есть свинины, говядины и баранины, рассказывают о его безусловной пользе. Противники — о вреде. И как понять, где правда, а где нет? Прочитав массу исследований и статей, мы для себя решили, что истина где-то посередине.

Если же не волнует нравственный аспект вопроса, то задуматься о том, сколько красного мяса мы едим ежедневно, все же стоит. Во всяком случае, об этом говорят и противники мясоедства, и сторонники сочных стейков. Как бы вегетарианцам и противникам мясных продуктов ни хотелось говорить только о вреде красного мяса, несомненно, есть и другая сторона медали. Конечно же, это хороший источник белка, который необходим для полноценного питания. Да, его можно заменить некоторыми другими продуктами, но только отчасти.

Именно красное мясо содержит большое количество железа, которое помогает поддерживать уровень гемоглобина, который в свою очередь, важен для развития красных кровяных телец. Значит, красное мясо помогает поддерживать нормальное кроветворение в нашем организме. Если сильно болели или перенесли операцию, то в этот период обязательно нужно употреблять мясо. Анемия и юный возраст также делают употребление красного мяса в определенных

дозах обязательным. Если у человека весомые физические нагрузки или умственное переутомление, ему также показано есть красное мясо хотя бы периодически. А для спортсменов мясо — это еще и богатый источник креатина. Чем его больше, тем больше кислорода поставляется к мышцам.

Многие гурманы готовы часами рассказывать, чем полезно красное мясо. Во-первых, оно богато железом и упомянутым гемоглобином, незаменимыми для синтеза красных кровяных телец. Во-вторых, животные белки являются строительным материалом для мышечных тканей и нервных волокон. В-третьих, красное мясо — это источник жизненно важных веществ для организма. Так, содержащийся в нем калий полезен для сердца и сосудов. Магний благотворно влияет на нервную систему. Цинк подпитывает силы иммунитета. Витамин РР поддерживает окислительно-восстановительные реакции. Кальций и фтор укрепляют кости и зубную эмаль. Витамины группы В активно участвуют в обменных процессах.

И это только часть полезных веществ, которые содержатся в мясе.

Ученые развеяли миф и о том, что миллионы лет назад человек появился именно мясоедом и на протяжении всей эволюции не испытывал серьезных проблем. Именно такой аргумент чаще всего выдвигают мясоеды в споре с вегетарианцами и умеренными любителями мясных блюд. Миллионы лет назад в популяции гоминид произошла мутация гена, отвечающего за синтез гликолилнейраминной кислоты. Именно это позволило организму сопротивляться малярийным эпидемиям. Ценой стала аллергия на гликолилнейраминную кислоту, содержащуюся в мясе других млекопитающих. Современный человек воспринимает эту кислоту из красного мяса как аллерген и чужеродный элемент.

И гарвардские ученые, и врачи всего мира начинают сходить в мнении, что если соблюдать нехитрые правила употребления красного мяса, то можно оставаться здоровым и не вредить своему организму.

Рекомендуется, что красное мясо нежелательно есть ежедневно, все врачи и диетологи мира, всемирные фонды здоровья вывели еженедельную норму красного мяса — не более 500 грамм. Это не так уж и мало. Среднего размера стейк, небольшая отбивная, пара сосисок, пара котлет — этого достаточно для недельного рациона. Важно между приемами красного мяса делать перерыв хотя бы в один день, заменяя его рыбой, птицей, морепродуктами.

Почему люди боятся мяса? Примером может послужить исследование, опубликованное в декабре 2016 года: Академия питания и диетологии США заявила, что растительная диета снижает риск сахарного диабета на 62 %, а также защищает от инфарктов и инсультов. И это далеко не все положительные эффекты растительной диеты. Красное мясо и рак. Когда речь

заходит об этом продукте, слово «рак» пугает потребителей больше всего.

В октябре 2015 года Всемирная организация здравоохранения опубликовала отчет, в котором красное мясо назвали «вероятным канцерогеном для человека». Помимо этого, эксперты ВОЗ пришли к заключению о канцерогенности переработанного мяса (подвергнувшегося обработке путем копчения, соления, ферментации и других процессов, продлевающих хранение). Чтобы подтвердить эти шокирующие выводы, Международное агентство по изучению рака (МАИР) ВОЗ проанализировало более 800 исследований. Было установлено, что каждые 50 граммов переработанного мяса в день — это дополнительные 18 % к риску колоректального рака (прежде всего, речь идет о копченном мясе) [1, 2, 3]. МАИР установило связь между красным мясом и такими заболеваниями, как рак кишечника, поджелудочной и предстательной железы. Считается, что наиболее опасные канцерогенные вещества образуются при высокотемпературной обработке мяса (барбекю). Поэтому любимые многими жареные кусочки вообще не рекомендуются к употреблению. Национальный институт рака США сообщает, что при термической обработке красного мяса образуются гетероциклические амины и полициклические ароматические углеводороды — вещества, известные своими выраженными канцерогенными свойствами [4, 5].

Что означает это решение от МАИР? Каким бы ни был основной механизм, теперь есть достаточные доказательства того, что МАИР считает, что обработанное мясо «определенно» вызывает рак, и что красное мясо «вероятно» вызывает рак. Но чтобы понять, что это означает (и это не значит), вам нужно немного узнать о категориях МАИР.

Когда МАИР оценивает данные о конкретном риске рака, он назначает его одной из нескольких групп, которые, как показано на рисунке ниже (Рис. 1), подтверждают обоснованную уверенность в том, что они вызывают рак у людей.

Обработанное мясо классифицируется как «определенная» причина рака (или канцероген 1-й группы) — та же группа, которая включает курение и алкоголь. А красное мясо является «вероятной» причиной рака (или канцероген группы 2а) — той же группы, что и сменная работа. Но важно помнить, что эти группы показывают, насколько уверенно МАИР утверждает, что красное и обработанное мясо вызывают рак, а не то, какие количества вызывают рак.

Как объясняет профессор Филлипс, «МАИР делает «идентификацию опасности», а не «оценку риска». Это означает, что МАИР не дает обоснование в какой мере тот или иной фактор может провоцировать рак, но утверждает, что определенный фактор вызывает рак или нет (Рис. 1) [6].

В 2011 году ученые подсчитали, что около 3 из 100 случаев рака в Великобритании были связаны с по-

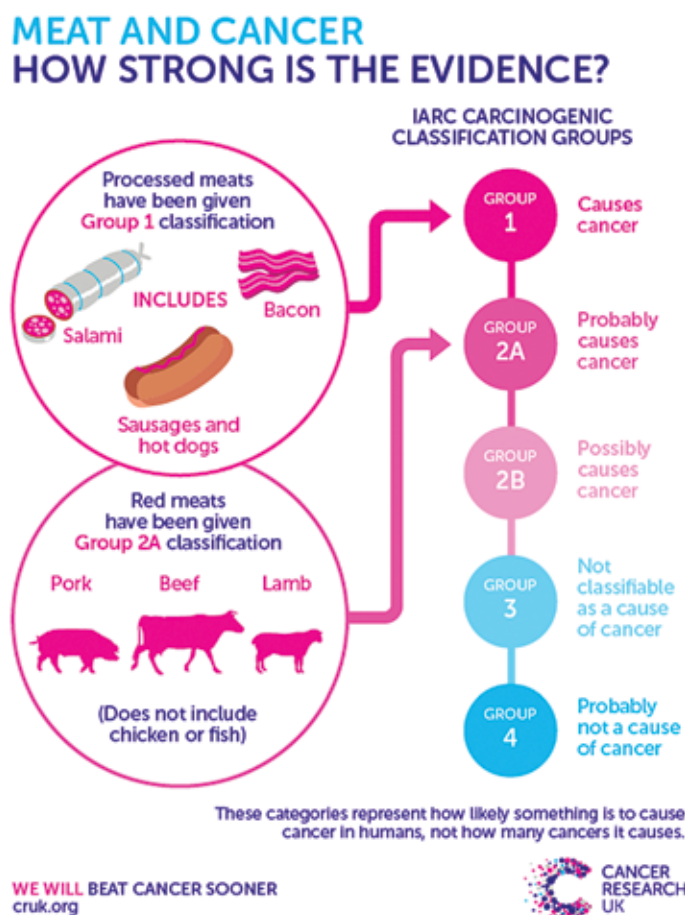


Рис. 1. Схема отнесения мяса и обработанного мяса по классификации МАИР к канцерогенному

реблению слишком большого количества красного и обработанного мяса (это около 8800 случаев в год). Для сравнения, например 64500 случаев выявленных опухолей связано с курением (или 19 процентов всех видов рака) [1].

Тем не менее, эксперты ВОЗ отмечают «недостаточно изученную» роль этих веществ в развитии рака у человека. Не отрицая при этом вред жареного мяса.

Мясо — польза или вред?

Научные обоснования

Консервирование мяса копчением или посолом

Начавшись приблизительно с конца 1960-х, идет социальная война против мяса, не много притихшая в конце 20-го века, и с новой силой разгоревшаяся во втором десятилетии 21 века. Это кажется немного странным, так как люди могут рассматриваться как всеядные от природы. Наши естественные диеты включают существенные количества продуктов растительного и животного происхождения. Сначала красное мясо было признано фактором вызывающим рак, сейчас говорят о том, что рак вызывает копченое мясо. Хотя теоретики уже придерживались этой точки зрения уже довольно давно.

Консервирование мяса копчением или посолом было методом сохранения в течение веков. В конце

прошлого столетия ученые обнаружили, что нитрит является ключевым консервантом в процессе. Нитрит не только предотвращает порчу, но и реагирует с пигментом мяса миоглобином, придавая соленому мясу, такому как окорок, его отличительный розовый цвет. Более важно то, что нитрит ингибирует микроорганизмы, которые вызывают ботулизм.

Однако в 70-е годы группы потребителей начали ставить под вопрос безопасность посоленных с нитритом продуктов. Ученые установили, что химическая реакция между нитритом и определенными компонентами белков, называемых аминами, формировали химические вещества, которые могли вызывать рак у лабораторных животных.

В 1998 году было проведено несколько исследований для обоснования иного мнения. М. Pariza, директор научно-исследовательского института питания в университете Висконсин-Мэдисон (UW-Madison) и председатель научно-экспертной группы Совета по сельскохозяйственным наукам и технологии в своем докладе отстаивал копчености, критикуя ранние исследования, в которых утверждалось обратное.

Роберт Cassens, почетный профессор в области наук о животных, в UW-Madison, который широко изучал нитриты в соленых мясных продуктах, говорил, что нитриты могут реагировать с аминами, образуя нитрозамины, которые являются причиной рака, однако, нитрозамины не определены в мясных изделиях химико-аналитическими методами. Он утверждал, что гипотетически, небольшой риск рака может возникнуть из нитритов, оставшихся в мясе, когда оно было съедено людьми, которые могли бы уже иметь амины в своих желудках. Например, некоторые лекарства содержат амины [7].

Благодаря другим сообщениям подобных этому Американское раковое общество в 1996 г заявило, что «нитриты в пищевых продуктах не являются существенной причиной для рака». В действительности нитриты и нитраты, которые могут быть превращены в нитриты в пищеварительной системе, обычно присутствуют во многих овощах. Например, у того, кто ест сандвич с беконом, латуком и помидором на обед, будет наблюдаться повышение уровня нитрита в крови. Частично это благодаря бекону, однако, большая часть обусловлена латуком и помидорами.

Что точно и как много едят, курят, пьют изучаемые объекты (мета-анализ больничных карт пациентов) и как много они занимаются физическим упражнением — в действительности только догадки. Не было достоверной информации о генетической предрасположенности к раку, что как полагают является основным фактором риска.

Технологии приготовления пищевой продукции копчением являются достаточно распространенными. При переработке животного, растительного или рыбного сырья в атмосфере копильного дыма часть

вредных полиароматических углеводов (ПАУ), которые даже не контролируются в нормативных документах многих стран, в том числе и в РФ [8], из тлеющей древесины может переходить в конечный пищевой продукт, делая его небезопасным для здоровья человека. Они, как считается, играют значительную роль в раковых заболеваниях человека [9, 10, 11].

В 2008 г. ПАУ были оценены Международной Программой по Химической Безопасности (International Programme on Chemical Safety, IPCS) Всемирной Организации Здравоохранения и Научным Комитетом ЕС по безопасности продуктов питания (Scientific Committee on Food, SCF) [12].

Результатом их работы стало заключение того, что 15 ПАУ, а именно, бенз[а]антрацен, бенз[б]флуорантен, бенз[ж]флуорантен, бенз[к]флуорантен, бенз[г, h, i]перилен, бенз[а]пирен, хризен, дибенз[а, h]пирен, дибенз[а, h]антрацен, дибенз[а, e]пирен, дибенз[а, i]пирен, дибензо[а, l]пирен, 5-метилхризен, инден[1,2,3-с, d]пирен, циклопента[с, d]пирен, обладают ярко выраженными канцерогенными, мутагенными и тератогенными свойствами [11]. Эти вещества — генотоксичные канцерогены, для которых нельзя устанавливать предельные величины безопасного содержания, ниже которых не будет появляться канцерогенный потенциал, ПАУ обладают свойством биоаккумуляции и способны провоцировать развитие опухолей.

«Фактом» является то, что мутагенные субстанции увеличивают риск рака и копченое (приготовленное) мясо имеет больше мутагенных субстанций, чем сырое мясо. Однако не многие исследователи указали, что при нагревании любого продукта, включая овощи, образуются сотни различных мутагенных субстанций. Все приготовленные пищевые продукты таким образом в конце концов вызовут рак [13].

Изучение накопления гетероциклических ароматических аминов, образующихся при жарении мяса

В 1993 году МАИР рассмотрели 8 Гетероциклических ароматических аминов (ГАА), (MeIQ, 8-MeIQx, PhIP, AaC, MeAaC, Trp-P-1, Trp-P-2 и Glu-P-1) как возможных канцерогенов для человека (класс 2B) и 1 (IQ) в качестве вероятного канцерогена для человека (класс 2A) и рекомендовало уменьшить воздействие этих соединений. Так в 2004 году, IQ, MeIQ, 8-MeIQx и PhIP были перечислены в Национальной программе по токсикологии, так как являются канцерогенными для человека [14]. Эти результаты основаны на выводах долгосрочных экспериментов на животных. Хотя эпидемиологические данные свидетельствуют о том, что потребление жареного мяса связано с повышенным риском развития рака у людей, данные недостаточны для подтверждения того, что этот риск обусловлен присутствием ГАА (MeIQ, 8-MeIQx или

PhIP). Выборочные исследования показывают очень противоречивые результаты.

ГАА, семейство мутагенных соединений [15], образуются во время процесса приготовления многих продуктов животного происхождения, включая курицу, говядину, свинину и рыбу. Мясо, приготовленное при умеренной температуре, имеет низкий уровень ГАА, но приготовленное на гриле или жаренное, может содержать значительное количество этих мутагенов [16, 17, 18].

Чем дольше мясо готовится и чем выше температура, тем больше образуются этих соединений. Проведенные исследования показали, что при приготовлении курицы-гриль обнаружены более высокие концентрации ГАА, чем в других видах мяса [19].

Основные классы гетероциклических аминов включают аминоксидазохинолины или аминоксидазохиноксалины (все вместе называемые соединения типа IQ) и аминоксидазопиридины, такие как PhIP. Соединения типа IQ и PhIP образуются из креатина или креатинина, специфических аминокислот и сахаров [20]. Все мясо (включая рыбу) имеют высокое значение креатина, и происходит максимальное образование ГАА при приготовлении мяса при высоких температурах, (гриле или жарке). Потребление хорошо прожаренного мяса и PhIP связано с повышенным риском рака молочной железы и рака толстой кишки [21].

Так в исследовании, проведенном в Университете штата Юта, которое включало 952 пациента с раком прямой кишки показало, что мужчины и женщины с самым высоким потреблением обработанного или хорошо приготовленного мяса имеют повышенный риск развития рака прямой кишки [22].

ГАА в больших дозах обнаруживаются в корке жареных на открытом огне и кулинарно обработанных мясе и рыбе. Эти соединения, по всей вероятности, формируются из креатинина, углеводов и аминокислот, как продуктов реакции Майяра. Было показано, что несколько ГАА являются мутагенными в тесте Эймса и канцерогенными в продолжительных опытах на грызунах и обезьянах МАИР классифицировало несколько ГАА как возможные или вероятные канцерогены для человека, и рекомендовало снижение воздействия этих субстанций (IARC, 1993). Помимо методов приготовления, физических параметров, таких как температура и время нагревания большое значение для образования ГАА имеет сырье. На образование ГАА оказывают влияние концентрации креатинина, углеводов и аминокислот и молярное соотношение между ними. В исследованиях сообщалось об оптимальном влиянии на образование ГАА в модельных системах, если молярное соотношение общего креатина и глюкозы было приблизительно $\frac{1}{2}$ молярного количества креатина к глюкозе; но если молярное содержание глюкозы увеличивалось, то образование ГАА снижалось [23, 24].

В поисках главного связующего звена между потреблением мяса и развитием рака ученые обнаружили канцерогенные вещества, названные гетероциклическими аминами, которые образуются при приготовлении мяса. Причем касается это не только красного мяса. Названные канцерогены часто присутствуют в хорошо прожаренной говядине, однако, уровень содержания их в жареной курице, а также рыбе оказался намного выше [25].

Красное мясо и рак — до сих пор нет убедительных доказательств

Отказ от мяса снижает риск развития рака примерно на сорок процентов. Более 30 лет ученые из Гарварда проводили масштабное исследование, в котором принимали участие 37 698 мужчин и 83 644 женщины, поделенные на 2 группы. Участники подбирались только физически здоровые. Первая группа наблюдалась в течение 28 лет, вторая — 22 года. За это время в группах умерло 23 926 участников, 5 910 — от сердечно-сосудистых заболеваний и 9 464 — от рака. Главным результатом масштабного исследования стал вывод, что слишком частое употребление красного мяса ведет к существенному возрастанию риска увеличения смертности от рака и болезней сердечно-сосудистой системы [26].

Еще один вывод — продолжительность жизни любителей ежедневного стейка падает на 13 % при употреблении порции не больше ладони свежеприготовленного красного мяса. А если в рационе в таком же объеме присутствует заранее обработанное мясо, например, бекон, то продолжительность жизни падает на 20 %. Риск рака для человека, ежедневно употребляющего свежее мясо, — 10 %, а обработанного — 16 %. Возможность проявления сердечно-сосудистых проблем у любителей свежего мяса возрастает на 18 %, а у любителей заранее обработанного — на 21 % [27].

Этот вред частого употребления красного мяса объясняется тем, что мы едим обработанное мясо, приготовленное с помощью жарки, тушения, консервации, в процессе которых вырабатываются канцерогены, патогенные белковые соединения, олигомерные белки. От последних возможны серьезные заболевания центральной нервной системы, нейроинфекции.

По данным исследований Гарвардского университета, в которых участвовали десятки тысяч мужчин и женщин, опасность возникновения рака толстой кишки уменьшается на две третьих, если снизить потребление обработанного мяса [28, 29, 30].

Не так давно было опубликовано новое исследование в British Medical Journal [31] — связанное с употреблением красного мяса и ранней диагностикой онко-заболевания. В нем приводились обсуждения взаимосвязей между употреблением красного мяса и рака молочной железы.

Если для других видов рака исследования по статистическим параметрам более или менее убедительны, то когда дело доходит до рака молочной железы, несмотря на несколько крупных исследований, весомых доказательств просто нет.

Итак, из чего складывается это новое исследование? Достаточно ли оно доказательно на сегодняшний день?

Это последнее исследование включало 88 803 женщин в пременопаузе, которые принимали участие в исследовании II медицинского исследования медсестер США — крупном когортном исследовании, которое началось в 1989 году. Эти женщины первоначально заполнили анкету по пищевым продуктам и о их потреблении пищи.

Анкета охватывала широкую корзину товаров, в том числе:

- необработанное красное мясо (например, говядина, свинина, баранина и гамбургеры).
- обработанное красное мясо (например, хот-доги, бекон, колбасы и салями).
- птица (цыпленок и индейка).
- рыба (например, тунец, макрель, лосось, сардины).
- бобовые (например, тофу или соевые бобы, фасоль, чечевица и горох) и орехи.

Женщины отметили, как часто они ели эти продукты, начиная от «никогда или менее одного раза в месяц» до «шести или более в день». Затем исследователи попросили их заполнить больше вопросников о пищевых продуктах — включая оценку того, сколько алкоголя они пили — в 1995, 1999, 2003 и 2007 годах.

Это позволило исследователям разделить женщин на пять разных групп в зависимости от количества каждой пищи, которую они ели.

И каждые два года группа исследователей собирала информацию о том, были ли диагностированы новые случаи рака молочной железы. Они также использовали эти вопросники для сбора информации о важных факторах риска, связанных с раком молочной железы, включая возраст, вес, историю семьи, курение и многое другое.

В течение следующих 20 лет у 2830 женщин развился рак молочной железы.

Когда группа исследователей проанализировала данные — принимая во внимание некоторые из ключевых факторов риска развития рака молочной железы, они подсчитали, что женщины в группе, которые регулярно потребляли наибольшее количество красного мяса, рассчитанные на одну половину порций в день, или эквивалент трех ломтиков бекона — имел 22-процентный риск рака молочной железы, по сравнению с женщинами в самой низкой мясной группе.

Как и во многих из этих исследований, это «относительный риск».

Затем они подсчитали, как возрастающий рост потребления красного мяса может повлиять на этот

относительный риск. Рассматривая среднее значение — или «медианное» — для приема пищи в каждой из пяти групп в течение всего периода исследования, они обнаружили, что каждая дополнительная «порция в день» красного мяса дала «предсказанный» 13-процентный повышенный риск развития груди рак у всех женщин — опять-таки «относительный» риск, из-за которого трудно извлечь реальную информацию.

Наконец, в своем статистическом анализе исследователи показали, что замена части красного мяса в день либо домашней птицей, либо бобовыми предсказывала снижение риска рака молочной железы на 17 % и 14 % у всех женщин, соответственно.

Итак, почему мы не можем сказать, что это исследование подталкивает красное мясо в категорию «да» для рисков, связанных с раком молочной железы?

Исследователи сделали хорошую попытку приспособить определенные факторы риска к развитию рака молочной железы. При этом факторы риска, такие как определенные генетические факторы, не были приняты во внимание.

Генетические факторы особенно трудно учесть в таком исследовании. Но это важно, потому что семейная история, связанная с генетикой, является одним из самых больших факторов, влияющих на риск рака молочной железы у женщины.

Таким образом, на основе последнего исследования и всех других доступных доказательств до сих пор нет четких доказательств связи между количеством красного мяса, которое женщина ест, и ее шансами на развитие рака молочной железы [31].

Основываясь на статистических исследованиях последних лет, в настоящее время имеется большое количество публикаций, подтверждающих связь между людьми, которые едят много красного или обработанного мяса и их шансами на развитие например рака кишечника [32, 33].

При изучении данного вопроса были проанализированные результаты семи исследований [34, 35, 36, 37, 38, 39, 40], которые лишь частично подтверждают незначительную ассоциацию с красным мясом. Практически все исследования были непоследовательными и недостаточно доказательными для ассоциирования повышенного риска развития рака толстой кишки с потреблением обработанного мяса.

Есть и достаточно противоречивые доказательства возможной взаимосвязи с образованием рака, приводящиеся в других научных литературных источниках. Работы Key et al., которые были опубликованы в марте 2009 года, и результаты европейской экспертной комиссии показали, что вегетарианцы более подвержены риску заболевания раком кишечника (на 39 % выше), чем невегетарианцы, которые в среднем в день употребляют мясо всех видов, за исключением рыбы, 65 г (мужчины) и 54 г (женщины). Почти к такому же результату относительно повышенного риска забо-

левания раком кишечника у вегетарианцев (на 16 % выше) в сравнении с людьми, употребляющими мясо в полезном для здоровья количестве, пришли уже в 2005 году ученые из Хайдельберга (Германия) при проведении исследованием с участием вегетарианцев [41, 42].

Чище пища

Прочитав сообщения о том, что рыба содержит «хорошие» жиры, многие люди перешли с мяса на рыбу. Однако, от «хороших» жиров толстеют так же, как и от любых других, о чем наглядно свидетельствуют коренные народы Арктики. Поедающие лосось люди склонны запасать «хорошие» жиры на талии, животе и бедрах.

Хуже всего то, что рыба, безусловно, представляет собой самую грязную пищу. Специалисты по охране окружающей среды ведут контроль над химическим загрязнением рыбы и регулярно предоставляют сводки. Например, недавно в одной из них Департамент окружающей среды штата Виржиния (Virginia's Department of Environmental Quality) сообщил, что содержание полихлорированных бифенилов (ПХБ) в зубатке и карпе составило до 3212 частей на миллиард, что превышает предельно допустимый уровень в пять раз. ПХБ — это химические вещества, которые используются в производстве электрооборудования, тормозной жидкости и безугольной копировальной бумаги. Эти вредные вещества скапливаются в реках и озерах, затем, подобно ртути и другим загрязняющим химикатам, через жабры проникают в рыбу, оседают в мышечной. Поскольку рыба мигрирует, и течения переносят химикаты с места на место, такое загрязнение сейчас наблюдается повсеместно. Воздушные потоки относят ртуть от электростанций и мусоросжигательных заводов на сотни и тысячи километров и сбрасывают в реки и моря. В результате, он оказывается в тунце и другой рыбе.

Когда дело доходит до здорового питания, многие из нас склонны одномоментно заикливаться на чем-то одном. Стоит появиться сообщением о загрязняющих химикатах, мы срочно переключаемся с рыбы на курицу или говядину. Как только СМИ начинают трубить о кишечной палочке E.Coli или сальмонелле, мы снова кидаемся к рыбе. Сколько красного мяса можно есть? Несмотря на удручающие цифры, в мясе содержится набор ценных нутриентов. 100-граммовая порция говяжьей вырезки дает взрослому человеку около 25 % суточной нормы витамина B₃, 32 % суточной нормы цинка, огромное количество железа и витамина B₁₂, калий, серу, фосфор, селен и другие элементы, а также незаменимые аминокислоты. Основываясь на этих данных и результатах последних исследований, мы советуем употреблять красное мясо регулярно, однако в ограниченных количествах. Американский институт по изучению рака рекомендует

взрослым людям съедать не более 18 унций (600 граммов) красного мяса в неделю, а переработанного мясного продукта — избегать вообще. «Диетологические рекомендации для американцев 2015–2020» гласят, что употреблять красное мясо следует в минимальных количествах, не уточняя, сколько именно. По мнению доктора Кристофера Уайлда (Christopher Wild), директора МАИР, нужно искать разумный баланс между высокой пищевой ценностью мясных продуктов и потенциальными рисками, многие из которых окончательно не доказаны [43].

mTOR, инсулиновый каскад и болезни цивилизации

mTOR (mammalian target of rapamycin) — белок, кодируемый у млекопитающих с помощью гена серин/треониновая протеинкиназа, регулирующая:

- рост клеток
- пролиферацию клеток
- подвижность клеток
- выживание клеток
- синтез белков
- транскрипцию

mTOR интегрирует различные сигнальные пути, в том числе пути инсулина, ростовых факторов и митогенов. mTOR функционирует как сенсор уровня питательных веществ и энергии в клетке, а также окислительно-восстановительного статуса. Нарушение регуляции mTOR приводит к развитию различных заболеваний, в том числе и различных типов рака.

Белок mTOR регулирует трансляцию (синтез на рибосомах) многих белков, в том числе тех, которые связаны с ростом клетки и ее размножением. Излишняя активация работы mTOR приводит к бесконтрольному делению клеток — то есть к превращению их в раковые. Поэтому очень важно определить, к синтезу каких именно белков mTOR имеет непосредственное отношение. Сделать это недавно удалось большой группе американских ученых [44].

Как известно, процесс образования раковой опухоли запускается на уровне генов: в клетке нарушается правильный баланс генной экспрессии, повышается транскрипция «опасных» генов и понижается транскрипция тех генов, которые должны были держать «опасные» гены «в руках». Получившиеся в результате транскрипции мРНК поступают в цитоплазму и там дают начало «опасным» белкам, которые заставляют клетку превратиться в раковую.

В норме работа mTOR регулирует прежде всего рост клетки и ее размножение. Это процессы очень тонкие, можно сказать «балансирующие на лезвии бритвы»: малейший перекося в одну сторону может привести к старению или смерти клетки, в другую — к ее бесконтрольному размножению и развитию раковой опухоли. Поэтому и слишком слабая, и, особенно, слишком «рьяная» работа mTOR очень опасна для ор-

ганизма. В частности, показано, что mTOR гиперактивен практически во всех случаях рака простаты (который является наиболее частым раком у мужчин) и при ряде других раков.

Группа американских исследователей под руководством Давида Руггеро (Davide Ruggero) и Кристиана Роммеля (Christian Rommel) [45] исследовала связь между активностью mTOR и развитием рака. Судя по результатам этих экспериментов, метастазирование в большой степени зависит от mTOR, и потому ингибирование этого белка может оказаться очень полезным при лечении раковой опухоли.

Основными регуляторами mTOR комплекса являются инсулин, инсулиноподобный фактор роста-1 (ИФР-1), аминокислотами (преимущественно лейцином) и оксидативным стрессом [46].

Инсулиновый каскад сильно консервативен у различных групп животных (позвоночных и беспозвоночных). Если у беспозвоночных животных insulin/ИФР1 имеет один путь, у высших позвоночных, в том числе, млекопитающих, этот путь подразделяется на два. Эти два пути имеют перекрывающиеся функции, но инсулин главным образом участвует в регуляции метаболизма, т.е. глюкоза сама по себе является активатором mTOR. Лейцином богато в первую очередь мясо, но не только, эта аминокислота содержится в молоке, сое и как пищевая добавка, в пиве. Одновременное потребление человеком пищи, богатой углеводами и белками является сильнейшим активатором комплекса mTOR (Рис. 2).

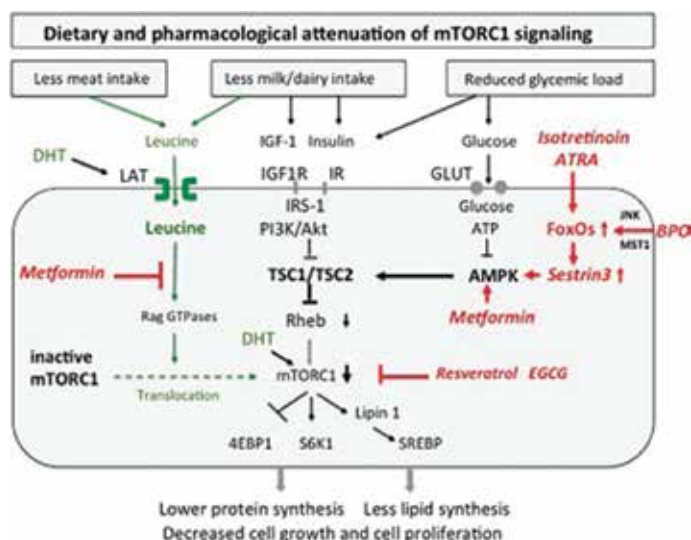


Рис. 2. Сигнальная система каскада mTOR

Как видно из Рис. 2 наиболее распространенная схема потребления мяса с хлебом и пивом (содержащим лейцин) является потенциально онкогенной. Тем не менее, потребление мяса без дополнительной нагрузки углеводными продуктами не способно запустить в полной мере этот каскад.

Ослабление сигналов от этих путей на различных стадиях продлевает жизнь самым разным модельным

организмам, и на настоящий момент не осталось сомнений, что регуляция именно этих путей — главный рычаг воздействия рациона на здоровье и долголетие.

Заключение

В глобальном масштабе нет стандартизованного способа обзора огромного объема исследований механизмов, с помощью которых факторы образа жизни могут вызывать рак. Тем не менее, в настоящее время ведется работа по разработке и тестированию новой методологии для проведения систематических обзоров механистических исследований, связанных с диетой, питанием, физической активностью, развитием и прогрессированием различных видов рака.

Этот процесс начался в 2012 году, когда Всемирный фонд исследований рака начал созывать специальную группу — Группу по разработке протоколов методологии. Эта группа разработала несколько первоначальных указаний о том, как систематически анализировать данные о механизмах образования рака. Цель заключалась в обеспечении того, чтобы у нас была методология для обзора механистических исследований, которые были столь же надежными, как протоколы, используемые для проведения систематических обзоров литературы эпидемиологических исследований.

В сентябре 2012 года Всемирная академия исследований рака (Академия WCRF) присудила грант команде в Бристольском университете, для продолжения разработки руководства по формированию подходов к оценке «онко» рисков. Разработанный доктором Сарой Льюис и профессором Ричардом Мартином в Университете Бристоля, новаторский новый метод оценки механистических исследований может стать глобальным основным подходом к оценке таких исследований. В настоящее время комплексный метод проверяется двумя группами из Маастрихтского университета и Немецкого онкологического научного центра, и в следующем году ожидается полностью сформированный научный отчет [47].

В мировой практике мясная продукция рассматривается как продукция высокого риска, для которой характерны как биологические, так и химические риски. В документах Кодекс Алиментариус и Международного эпизоотического бюро (МЭБ) содержатся указания к применению риск-ориентированного подхода к анализу продукции животного происхождения. Однако в Кодекс Алиментариус они относятся к готовому продукту и рассматриваются относительно здоровья человека, а в документах МЭБ в большей части к ветеринарному благополучию сельскохозяйственных животных. Технологическая составляющая не выделяется в указанных документах, однако именно она служит существенным механизмом управления как отдельными рисками, так и их совокупностью, что позволяет производить продукт гарантированной безопасности в течении срока его годности.

Во многом вред от красного мяса определяется не столько свойствами, сколько способами его приготовления и сочетанием с другими продуктами питания. Часто продукт становится вредным из-за незнания элементарных правил его употребления. В целом, настоящий обзор делает акцент на том, что видовые различия и данные о механизмах токсического действия должны приниматься во внимание при переносе данных о канцерогенных рисках, полученных при использовании больших доз исследуемого вещества на экспериментальных животных, на человека, получающего малые дозы этого вещества.

На основе новых знаний о содержании в мясном сырье белков и пептидов, обладающих различной биологической активностью, становится возможным идентификация и изучение белкоматричных компонентов, влияющих на трансляцию mTOR. Излишняя активация работы mTOR приводит к ошибкам в синтезе белков, к окислительному повреждению ДНК, что может способствовать превращению клеток в рако-

вые. Белок mTOR реагирует на сигналы, поступающие от питательных веществ, факторов роста и клеточного энергетического статуса и контролирует клеточный рост и пролиферацию. Идентификация mTOR ассоциированных компонентов, а также канцерогенных веществ различной химической природы и проведение анализа рисков для выявленных компонентов относительно здоровья человека в части возможного канцерогенного эффекта — является на сегодняшний день одной из приоритетных задач практических исследований пищевой биохимии и аналитического контроля. Необходима идентификация и изучение молекулярно-биологических механизмов метаболизма различных ксенобиотиков, специфических белковых и пептидных и других веществ, обладающих различными эффектами, запускающими каскад биохимических реакций, способствующих развитию канцерогенеза. Также необходимым является создание новых подходов в изучении токсикокинетики и механизмов токсического действия и разработка новых биомоделей.

Introduction

At present, there is an increasing market of food products with real and expected healthy properties. The development of this market stimulated by a consumer opinion that «natural is safe» leads to an increase in the use of plant products as bioactive ingredients in functional nutrition and as food additives and spices.

Red meat is an acknowledged leader of gastronomic preferences all around the world. However, the properties of this product and its effect on the human body cause intense disputes. It is especially topical to study these aspects in the framework of the Strategy of the scientific and technological development of the Russian Federation aimed at increasing the life quality of the population, ensuring the country's security and strengthening the Russia's position in the global rating of the standard of living due to the creation of the demanded products, goods and services on the basis of the cutting-edge scientific research.

However, let's first clarify what is red meat. Primarily, it is beef, pork, mutton and horse meat. Rabbit meat, which reddens with age, can also be added to this list. Their characteristic color is conditioned by myoglobin — a special protein in meat tissues. Red meat of poultry (chicken, goose, turkey, guinea fowl) also belongs to this type. Only dietic poultry breast is considered white meat, while the rest parts of a carcass is red meat.

Proponents of red meat, that is pork, beef and mutton, claim its undoubted benefits, while opponents talk about its harmful effects. How to understand where the truth is? After studying many results of the investigations and articles, we decided for ourselves that the truth lies somewhere in the middle.

If someone is not concerned with the ethical aspect of the question, it is, nonetheless, necessary to think about

how much red meat we eat daily. At least, that is what both opponents of meat eating and proponents of juicy steaks say. Regardless of how much vegetarians and opponents of meat products want to talk only about the harmful effects of red meat, undoubtedly, there is the other side of the coin. Certainly, it is a good source of protein, which is necessary for full-value nutrition. Of course, it can be replaced by several other products, but only partly.

It is red meat that contains high amounts of iron, which helps to maintain the level of hemoglobin, which, in turn is necessary for the development of erythrocytes. Therefore, red meat helps to maintain normal haematopoiesis in the human body. If a person has been seriously ill or has undergone surgery, it is necessary to eat meat in this period. Anemia and young age also make red meat consumption in certain doses essential. If people have a substantial level of physical activities or mental stress, it is recommended to eat red meat, at least, from time to time. For sportsmen, meat is also a rich source of creatine. The higher its amount, the more oxygen is delivered to muscles.

Many gourmands are ready to talk about red meat benefits for hours. First, it is rich in iron and abovementioned hemoglobin, which are necessary for synthesis of the red blood cells.

Secondly, animal proteins are a building material for muscle tissues and nerve fibers. Third, red meat is a source of essential substances for the body. For example, potassium is good for heart and blood vessels. Magnesium has beneficial effects on the nervous system. Zinc strengthens immunity. Vitamin PP supports redox reactions. Calcium and fluorine strengthen bones and tooth enamel. B-complex vitamins actively participate in metabolic processes.

And this is only part of wholesome substances that are contained in meat.

Scientists dispelled the myth that millions years ago humans appeared as meat eaters and throughout the whole evolution did not have serious problems. It is this argument that is more often proposed by meat eaters in a dispute with vegetarians and people moderately consuming meat. Millions years ago, the mutation in the gene responsible for the synthesis of the glycolylneuraminic acid occurred in the population of hominids. This allowed an organism to resist malaria epidemics. The price was an allergy to glycolylneuraminic acid contained in meat of other mammals. Modern humans perceive this acid from red meat as an allergen and foreign element.

Both the Harvard scientists and physicians from the whole world are coming to an agreement that when observing simple rules for red meat consumption, it is possible to remain healthy and not to do harm to the body.

It is recommended not to eat red meat every day. All world physicians and dietitians, as well as international health foundations concluded that the weekly norm of red meat should be not more than 500 gram. This is quite a lot. A medium size steak, small chop, two Frankfurt sausages, two cutlets are enough for the week ration. It is important to take a break for at least one day from red meat consumption replacing it with fish, poultry and seafood.

Why are people afraid of meat? The research published in December 2016 can serve as an example: The US Academy of Nutrition and Dietetics claimed that plant-based diets could reduce the risk of diabetes mellitus by 62 % and protect from heart attacks and strokes. And this not all positive effects of plant-based diets. Red meat and cancer. When it comes to this product, cancer is the scariest word for consumers.

In October 2015, the World Health Organization (WHO) published a report, in which red meat was classified as «probably carcinogenic to humans». Moreover, the WHO experts came to a conclusion about carcinogenicity of processed meat, i.e. meat underwent processing by smoking, salting, fermentation and other processes extending storage). To confirm this shocking conclusion, the WHO's International Agency for Research on Cancer (IARC) analyzed more than 800 studies. It was established that each 50 grams of processed meat (mainly, smoked meat) lead to an 18 % higher risk of colorectal cancer [1,2,3]. The IARC established an association between red meat and such diseases as colorectal, pancreatic and prostate cancers. It is believed that the most hazardous carcinogenic substances are formed at high temperature cooking of meat (barbecuing). Therefore, fried meat pieces that are loved by many people are not recommended for consumption. The US National Cancer Institute informs that heterocyclic amines (HCAs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), which have well-known carcinogenic properties, are generated during thermal treatment of red meat [4,5]

What does this decision of IARC mean? Whatever the main mechanism, there is sufficient evidence that IARC is of the opinion that processed meat is «carcinogenic to

humans,» and red meat is «probably carcinogenic to humans». However, to understand what this means (or does not mean), you need to learn about the categories of IARC.

When IARC assesses the data about a particular risk of cancer, it assigns it to one of several groups, which, as shown in the graphic below (Fig. 1), confirm the justified confidence that they cause cancers in humans.

Processed meat is classified as an 'unambiguous' cause of cancer (or a Group 1 carcinogen) — the same group as tobacco smoking and alcohol. Red meat is a probable cause of cancer in humans (or a Group 2A carcinogen) — the same group as shift work. However, it is necessary to remember that these groups show how confidently IARC states that red and processed meat cause cancer rather than what quantities cause cancer.

As Professor Phillips explains, «IARC does 'hazard identification', not 'risk assessment' ». This means that IARC does not substantiate to what extent the factor can provoke cancer, but rather states whether a certain factor causes cancer or not» (Figure 1) [6].

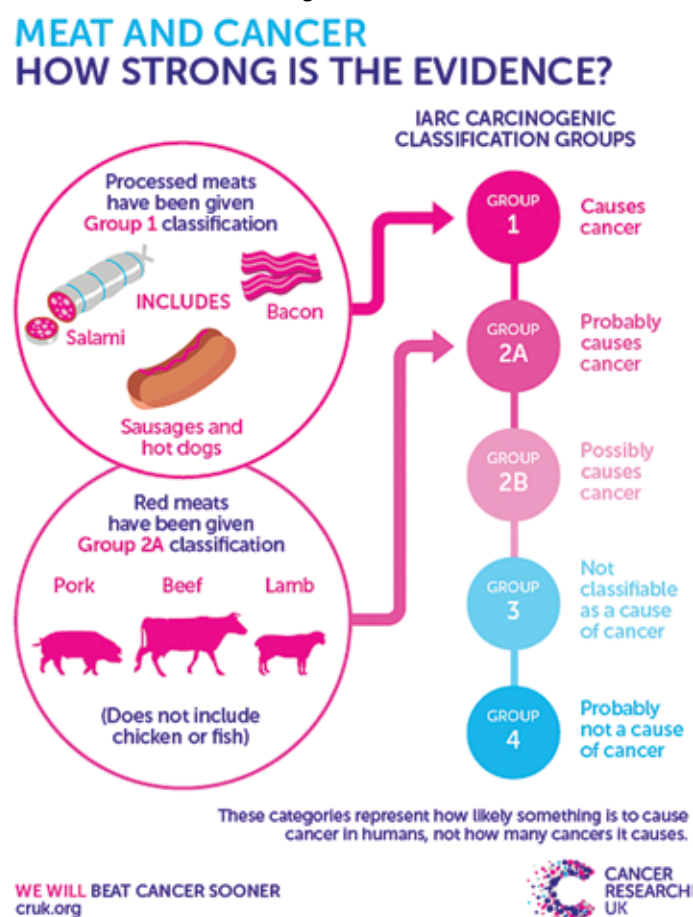


Figure 1. A diagram of classifying meat and processed meat as carcinogenic in accordance with IARC

According to scientists' estimates made in 2011 about 3 in every hundred cases of cancer (or about 8,800 cases per year) in the UK were linked to consumption of too high amount of red and processed meat. For comparison, 64,500 cases of identified tumors (or 19 percent of all cancers) were due to smoking [1].

Nevertheless, the WHO experts denote «insufficiently studied» role of these substances in cancer development in humans without denying the hazard of fried meat.

Meat — benefit or harm? Scientific substantiation

Meat preservation by smoking or salting

Beginning approximately from the end of the 1960s, a social war against meat has been going on; it slightly quieted down at the end of the 20th century but heated up in the second decade of the 21st century. It seems rather strange as people can be considered omnivorous by nature. Our natural diets include substantial amounts of products of plant and animal origin. At first, red meat was acknowledged as a factor causing cancer; now, it is said that cancer is caused by smoked meat. However, the theorists have adhered to this point of view for quite a long period of time.

Meat smoking or salting have been preservation methods for centuries. At the end of the last century, scientists found that nitrite was a key preserving agent in the process. Nitrite not only prevents spoilage, but also reacts with the meat pigment myoglobin imparting cured meat, such as ham, its characteristic pink color. And what is more important, nitrite inhibits microorganisms that cause botulism.

However, in the 1970s, consumer groups began to put into question the safety of products cured with nitrite. Scientists established that the chemical reaction between nitrite and certain components of proteins, called amines, formed chemical compounds that were able to cause cancer in laboratory animals.

In 1998, several studies were carried out to substantiate a different conclusion. M. Pariza, director of the Food Research Institute at the University of Wisconsin-Madison (UW-Madison) and chair of the scientific group of the Council of the Agricultural Sciences and Technology in his report defended smoked products and criticized at the same time earlier investigations, in which the contrary was stated.

Robert Cassens, emeritus professor of animal science at UW-Madison, who has extensively studied nitrites in cured meat products, said that nitrites could react with amines forming nitrosamines, which are causes of cancer; however, nitrosamines were not found in cured meat products by analytical chemistry methods. He claimed that hypothetically, a small risk of cancer may arise from nitrites remaining in meat when it was eaten by people who might already have amines in their stomachs. For example, certain medicines contain amines [7].

Based on the reports similar to the above mentioned, the American Cancer Society in 1996 stated that nitrites in food were not a significant cause of cancer. In fact, nitrites and nitrates, which can be transformed to nitrites in the digestive system, are commonly present in many vegetables. For example, consumption of a bacon, lettuce and tomato sandwich for lunch can lead to an increase in blood nitrite levels. Partly, this is associated with the bacon, but a larger amount is linked to the lettuce and the tomato. [7].

What exactly and how much the studied objects ate, smoked, drank (meta-analysis of the hospital patient charts) and how much they did physical exercises are actually only assumptions. There was no reliable information about the genetic predisposition to cancer, which is thought to be the main risk factor.

Technologies for food preparation by smoking are quite common. When processing animal, plant or fish raw material in an atmosphere of smoking fume, part of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), which are not controlled in the normative documents of many countries including the RF [8], can be transferred from smoldering wood to the final food product making it unsafe for human health. It is considered that they play an important role in oncological human diseases [9, 10, 11].

In 2008, PAHs were assessed by the International Programme on Chemical Safety, IPCS of the World Health Organization and Scientific Committee on Food (SCF) [12].

The result of their work was the conclusion that 15 PAHs, namely benz[a]anthracene, benzo[b]fluoranthene, benzo[j]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[ghi]perylene, benzo[a]pyrene, chrysene, cyclopenta[cd]pyrene, dibenz[a, h]anthracene, dibenzo[a, e]pyrene, dibenzo[a, h]pyrene, dibenzo[a, i]pyrene, dibenzo[a, l]pyrene, indeno[1,2,3-cd]pyrene and 5-methylchrysene have clear carcinogenic, mutagenic and teratogenic properties [11]. These substances are genotoxic carcinogens, for which limits of PAH safe content, below which the carcinogenic potential would not appear, cannot be established; PAHs have an ability to bioaccumulate and provoke the tumor development.

It is the «fact» that the mutagenic substances increase the risk of cancer and smoked (processed) meat has more mutagenic substances than raw meat. However, few researchers indicated that hundreds of different mutagenic substances are formed upon heating any food product including vegetables. All prepared product, therefore, will cause cancer at long last [13].

Study on the accumulation of the heterocyclic aromatic amines formed during meat frying

In 1993, IARC examined 8 heterocyclic aromatic amines (HAAs) (MeIQ, 8-MeIQx, PhIP, AaC, MeAaC, Trp-P-1, Trp-P-2 and Glu-P-1) as possible human carcinogens (Group 2B) and 1 (IQ) as a probable human carcinogen (Group 2A) and recommended reducing the exposure to these substances. In 2004, IQ, MeIQ, 8-MeIQx and PhIP were listed in the National Toxicology Program as they are carcinogenic to humans [14]. These results are based on the conclusions of the long-term experiments on animals. Although the epidemiological data indicate that fried meat consumption is linked to an increased risk of developing cancer in humans, the data are insufficient to confirm that this risk is conditioned by the presence of HAAs (MeIQ, 8-MeIQx or PhIP). Selected studies gave quite contradicting results.

HAAs, a family of mutagenic compounds [15], are formed during the process of preparation of many prod-

ucts of animal origin, including chicken, beef, pork and fish. Meat prepared at a moderate temperature has low level of HAAs, but when grilled or fried, it can contain a significant amount of these mutagens [16, 17, 18].

The longer meat is prepared and the higher the temperature, the higher amount of these compounds is formed. The performed investigations showed that when grilling chicken, the higher HAA concentrations were found compared to other meat types [19].

The main classes of heterocyclic amines include amino-imidazoquinolines or amino-imidazoquinoxalines (in total called IQ type compounds) and amino-imidazopyridines such as PhIP. Compounds of IQ and PhIP types are formed from creatine or creatinine, specific amino acids and sugars [20]. All meat (including fish) has high value of creatine and the maximum HAA formation occurs when preparing meat at high temperature (grilling or frying). Consumption of well-done meat and PhIP is linked to an increased risk of breast and colon cancer [21].

For example, the study carried out at the University of Utah, which included 952 patients with rectal cancer, showed that men and women with the highest consumption of processed or well-done meat had an increased risk of rectal cancer [22].

HCAs in large doses are found in the crust of fried on an open fire and culinary processed meat and fish. These compounds are apparently formed from creatinine, carbohydrates and amino acids as products of Maillard reaction. It was shown that several HCAs were mutagenic in Ames test and carcinogenic in long-term experiments in rodents and monkeys. IARC classified several HCAs as possible and probable carcinogens for humans and recommended reducing an exposure to these substances (IARC, 1993). In addition to methods of preparations, physical parameters such as temperature and time of heating, raw materials also play an important role in formation of HCAs. The HCA formation is influenced by the concentrations of creatinine, carbohydrates and amino acids, as well as their molar ratio. Several studies report about the optimal effect on HCA formation in model systems, if the molar ratio of creatine and glucose was about 1/2 of the molar quantity of creatine relative to glucose; however, if the molar content of glucose increased, the HCA formation decreased [23, 24].

In search of the main link between meat consumption and the development of cancer, scientists found carcinogenic substances called heterocyclic amines, which are formed during meat cooking. Moreover, this is related not only to red meat. The above mentioned carcinogens are often present in well-done beef; however, the level of their content in fried chicken and fish turned to be much higher [25].

Red meat and cancer — there is no conclusive evidence yet

Meat rejection reduces the risk of cancer development approximately by 40 %. For more than 30 years, the scientists from Harvard carried out a large-scale investigation,

which included 37,698 men and 83,644 women allocated to two groups. Only physically healthy participants were enrolled into the investigation. The first group was observed for 28 years, the second for 22 years. During this time, 23,926 participants died, including 5910 of cardiovascular diseases and 9,464 of cancer. The main result of the large-scale study was a conclusion that too frequent red meat consumption led to a significant growth in the risk of an increase in mortality from cancer and cardiovascular diseases [26].

Another conclusion is a 13 % decrease in the longevity of people consuming steaks every day when the portions of freshly prepared red meat are not larger than a palm of the hand. If a diet contains the same volume of preliminary processed meat (for example, bacon), than life duration drops by 20 %. The risk of cancer for a person daily consuming fresh meat and processed meat is 10 % and 16 %, respectively. The possibility of manifestation of cardiovascular diseases increases by 18 % for people preferring fresh meat and by 21 % for those who consume preliminary processed meat [27].

The harmful effects of frequent red meat consumption can be explained by the fact that we eat processed meat, prepared by frying, stewing and preservation, during which the carcinogens, pathogenic protein substances, oligomeric proteins are formed. The latter can cause serious diseases of the central nervous system, neuroinfections.

According to the data of the studies of the Harvard University, which included tens of thousands of men and women, the risk of the colon cancer development decreased by two thirds if the consumption of processed meat was reduced [28, 29, 30].

Recently, the new study was published in the British Medical Journal [31] related to the red meat consumption and early diagnostics of oncological disease. It presents discussion about the relationship between red meat consumption and breast cancer.

If for other types of cancer, studies are more or less convincing by statistical parameters, there is no hard evidence in case of breast cancer despite several large-scale studies.

So, what is this new study composed of? Is it sufficiently convincing today?

The latter study included 88,803 premenopausal women, who participated in the US Nurses' Health Study II — the large cohort study, which was begun in 1989.

These women initially answered the questionnaire about food products and their dietary intake. The questionnaire included a wide range of goods including:

- unprocessed red meat (for example, beef, pork, lamb and hamburgers)
- processed red meat (for example, hot dogs, bacon, sausages and salami);
- poultry (chicken and turkey);
- fish (for example, tuna, mackerel, salmon, sardines);
- legumes (for example, tofu or soybeans, string beans, lentils, and peas) and nuts.

The women answered how often they ate these products ranging from «never or less than once per month» to «six or more per day». Then the researchers asked them to answer more questionnaires including an assessment of how much alcohol they drank in 1995, 1999, 2003 and 2007.

This allowed researchers to divide women into five different groups depending on the consumed amounts for each food group.

Biennially, the group of researchers collected information about the new cases of breast cancer. They also used these questionnaires to collect information about important risk factors linked to the breast cancer, including age, weight, family history, smoking and many others.

During the following 20 years breast cancer developed in 2830 women.

When the group of researchers analyzed the data taking into consideration some of the key factor for the risk of developing breast cancer, they estimated that the women in the group, which regularly consumed the highest amount of red meat calculated per a half of a serving/day or an equivalent of three bacon slices, had 22 % risk of breast cancer compared to the women in the group of the lowest meat consumption.

As in many of such investigations, this is a «relative risk».

Then they estimated that an increased red meat consumption could influence this relative risk. Using the median value for food intake in each of five groups throughout the study, they found that each additional serving/day of red meat resulted in a predicted 13 % increase in the risk of breast cancer in all women — again, a «relative risk», from which it is different to elicit the real information.

Finally, in their statistical analysis, the researchers demonstrated that partial replacement of red meat/day with poultry or legumes predicted a 17 % and 14 % lower risk of breast cancer in all women, respectively.

So, why can't we say that this study pushes red meat into the category «yes» for risks associated with breast cancer?

The researchers made a good attempt to adjust certain risk factors to the development of breast cancer. With that, such risk factors as certain genetic factors were not taken into consideration.

The genetic factors are especially difficult to take into account in such study. However, it is important because family history linked to genetics is one of the largest factors influencing the risk of breast cancer in a woman.

Therefore, as can be seen from the latter study and other available evidence, there are still no hard data on the association between an amount of red meat that a woman eats and her chances of developing breast cancer [31].

Based on the statistical publications of the last years, recently, there are many publications that confirm an association between people eating a lot of red or processed meat and their chances of developing intestinal cancer, for example [32, 33].

When considering this question, we analyzed the results of seven studies [34, 35, 36, 37, 38, 39, 40], which only partly confirmed an insignificant association with red meat. Practically all studies were inconsistent and insufficiently convincing to link an increased risk of the colon cancer development with processed meat consumption.

There is also quite contradictive evidence about the possible relation with cancer development that are presented in other literature sources. The results of the research of Key et al. published in March 2009, as well the results of the European expert commission showed that vegetarians had a 39 % higher risk of intestinal cancer compared to non-vegetarians, who on average consumed 65 g (men) and 54 g (women) of all types of meat, excluding fish, per day. As far back as 2005, when doing their research with participation of vegetarians, the scientists from Heidelberg (Germany) came almost to the same conclusion regarding an increased risk of intestinal cancer in vegetarians (by 16 %) compared to people consuming meat in quantities beneficial for health [41, 42].

Cleaner food

After reading reports that fish contains «good» fats, many people changed from meat to fish. However, it is possible to gain weight from «good» fats like from any others, which can be clearly seen on the example of indigenous people in the Arctic. People eating salmon are prone to store «good» fats on their waists, bellies and thighs.

The worst thing is that fish, undoubtedly, is the most contaminated food. Environmentalists monitor chemical contamination of fish and regularly made reports. For example, not long ago, Virginia's Department of Environmental Quality reported that content of polychlorinated biphenyls (PCBs) in wolfish and carp was 3212 parts per billion, which exceeded the maximum allowable limit by 5 times. PCBs are chemicals, which are used in production of electrical equipment, braking fluid and carbonless copy paper. These hazardous substances are accumulated in rivers and lakes; then, similar to mercury and other contaminating chemicals penetrate into fish and settle in the muscle tissue. As fish migrates and currents transfer chemicals from place to place, this pollution is observed everywhere. Air currents transfer mercury from electric power plants and waste incineration plants over hundreds and thousands kilometers and drop to rivers and seas. As a result, it is found in tuna and other fish.

When it comes to healthy nutrition, many of us tend to become immediately concentrated on a single thing. When the reports about pollutants appear, we quickly change from fish to chicken or beef. When mass media begin to trumpet about *Escherichia coli* or salmonellosis, we again rush to fish. How much red meat may we eat? Despite depressing figures, meat contains a complex of valuable nutrients. One hundred portion of beef sirloin gives an adult about 25 % of daily norm of vitamin B₃, 32 % of daily norm of zinc, huge amounts of iron and

vitamin B₁₂, potassium, sulfur, phosphorus, selenium and other elements, as well as essential amino acids. Based on these data and the results of the recent studies, we recommend consuming red meat regularly, however, in restricted quantities. The American Institute for Cancer Research (AICR) recommends adults to eat not more than 18 ounces (660 g) of red meat per week and avoid processed meat products. 2015–2020 Dietary Guidelines for Americans state that red meat should be consumed in minimal amounts without specifying how much. According to the opinion of Dr. Christopher Wild, director of IARC, it is necessary to find a reasonable balance between high nutritional value of meat products and potential risks, many of which are not conclusively proved [43].

mTOR, insulin cascade and diseases of civilization

Mammalian target of rapamycin (mTOR) is a protein encoded in mammals by the gene of serine/threonine protein kinase that regulates:

- cell growth
- cell proliferation
- cell motility
- cell survival
- protein synthesis
- transcription

mTOR integrates different signal pathways, including the pathways of insulin, growth factors and mitogens. mTOR functions as a sensor of cellular nutrient and energy levels as well as the redox status. Dysregulation in mTOR leads to the development of different diseases, including different types of cancer.

mTOR protein regulates translation (synthesis on ribosomes) of many proteins, including those that are connected with cell growth and multiplication. The mTOR hyperactivation leads to uncontrolled cell division; that is, to their transformation into cancer cells. Therefore, it is very important to precisely determine proteins, to which synthesis mTOR is directly related. Recently, the large group of American scientists managed to achieve this [44].

It is known that a process of cancer development is triggered at the gene level: the right balance of gene expression is disturbed, the transcription of the «dangerous» genes increases and the transcription of the genes that have to «keep a check on» the «dangerous» genes decreases. mRNA resulted from the transcription enters the cytoplasm and gives rise to the «dangerous» proteins, which makes a cell turn into a cancer cell.

Normally, mTOR activity regulates, first of all, cell growth and multiplication. These processes are very fine; it can be said that they «balance on a razor blade»: the smallest shift to one side can lead to cell ageing or death, to another — to its uncontrolled proliferation and cancer development. Thus, too weak and, especially, too «zealous» mTOR activity is very dangerous for the human body. In particular, mTOR hyperactivity was demonstrated virtually in all cases of prostate cancer (which is the most com-

mon cancer type in men) and in several other cancer types.

The group of American researchers under the leadership of Davide Ruggero and Christian Rommel [45] studied an association between the mTOR activity and cancer development. According to the results of these experiments, metastases to a large extent depend on mTOR, and, therefore, inhibition of this protein can be quite useful in cancer treatment.

The major regulators of the mTOR complex are insulin, insulin-like growth factor 1 (IGF1), amino acids (mainly, leucine) and oxidative stress [46].

The insulin cascade is very conservative in different animal groups (vertebrates and invertebrates). In invertebrates, insulin/IGF1 has one pathway; however, in higher vertebrates, including mammals, this pathway is divided into two. These two pathways have overlapping functions, but insulin mainly takes part in metabolism regulation; that is, glucose per se is the mTOR activator. Leucine is abundant, first of all, in meat, but not only in it; this amino acid is contained in milk, soya and, as a food additive, in beer.

Simultaneous consumption of food rich in carbohydrates and proteins is a potent activator of the mTOR complex (Figure 2).

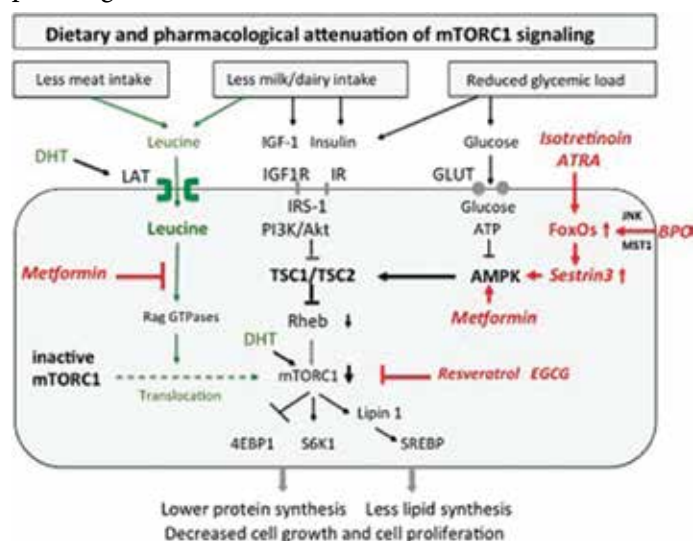


Figure 2. Signalling system of the mTOR cascade

As can be seen from Figure 2, the most common pattern of meat consumption with bread and beer (containing leucine) is potentially oncogenic. Nevertheless, consumption of meat without an additional load of carbohydrate foods cannot trigger this cascade to the full extent.

Weakening of these pathway signals at different stages prolongs life of different model organisms, and at present, there are no doubts that regulation of precisely these pathways is the main lever for a diet impact on health and longevity.

Conclusion

Globally, there is no standardized method for reviewing the vast amount of studies on the mechanisms, by which lifestyle factors can cause cancer. At present, however, the work is continued on the development and testing of new

methodology for performing systematic reviews of mechanistic investigations associated with a diet, nutrition, physical activity, and the development and progression of different types of cancer.

This process was begun in 2012, when World Cancer Research Fund International assembled a special team for developing the methodology — the Mechanisms Protocol Development Group. This group developed the initial guidance on how to systematically analyze evidence on mechanisms of cancer development. The aim was to ensure that we would have a methodology for reviewing mechanistic research that would be as robust as the protocols used to perform the systematic literature reviews (SLRs) of the epidemiological studies.

In September 2012, World Cancer Research Fund International's Academy (WCRF Academy) awarded a grant to the team at the University of Bristol to continue developing the guidance for formation of approaches to «onco-» risks assessment. The innovative new method for assessment of mechanistic studies developed by Dr. Sarah Lewis and Prof. Richard Martin at the University of Bristol can become the global main approach to assessment of such studies. Currently, the complex method has been tested by two groups from Maastricht University and the German Cancer Research Center and the fully formed scientific report is expected to be issued next year [47].

In world practice, meat products are regarded as products of high risk, for which both biological and chemical risks are typical. The documents of Codex Alimentarius and World Organisation for Animal Health (OIE) contain instructions on the use of the risk-oriented approach to analysis of products of animal origin. However, in Codex Alimentarius, they refer to finished products and are considered in terms of human health, while in the OIE documents they mainly refer to veterinary wellbeing of farm animals. The technological constituent is not highlighted

in the above-mentioned documents; however, it is a significant mechanism of management of individual risks and their complex, which enables production of products with guaranteed safety throughout their shelf-life.

To a large extent, harmful effects of red meat is determined not only by properties, but by the ways of its preparation and combination with other foods. Often, a product becomes harmful because there is no knowledge of elementary rules of its consumption. In general, this review emphasizes the fact that species differences and the data on the mechanisms of toxic action should be taken into account when transferring data about carcinogenic risks obtained upon the use of high doses of the studied substance in the experimental animals to humans receiving low doses of this substance.

On the basis of new data about the content in meat raw material of proteins and peptides with different biological activity, it is possible to identify and study protein matrix components affecting mTOR translation. mTOR hyperactivation leads to errors in protein synthesis and DNA oxidative damage, which can result in cell transformation into cancer cells. mTOR protein responds to the signals from nutrients, growth factors and cellular energetic status and control cell growth and proliferation. Identification of mTOR associated components and carcinogenic substances of different chemical nature as well as risk analysis for detected components regarding human health in terms of the possible carcinogenic effect are among the current top priority tasks of practical research in food biochemistry and analytical control. It is necessary to identify and study the molecular biochemical mechanisms of metabolism of different xenobiotics, specific protein, peptide and other substances with different effects that trigger a cascade of biochemical reactions promoting cancer development. It is also necessary to create new approaches to study toxicokinetics and mechanisms of toxic action, as well as to develop new biomodels.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Monographs evaluate consumption of red meat and processed meat. [Электронный ресурс: <http://scienceblog.cancerresearchuk.org/2015/10/26/processed-meat-and-cancer-what-you-need-to-know/IARC>. Дата обращения 15.10.2017]
2. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. Published early online October 26, 2015 in The Lancet Oncology. First author Veronique Bouvard, International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group, Lyon, France. [Электронный ресурс: <https://www.cancer.org/latest-news/world-health-organization-says-processed-meat-causes-cancer.html#citations//> Дата обращения 15.10.2017]
3. Chan, D.S.M., Lau, R., Aune, D., Vieira, R., Greenwood, D.C., Kampman, E., Norat, T. (2011). Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PLoS ONE*, 6(6), № article e20456
4. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F. GLOBOCAN2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. [Электронный ресурс: <http://globocan.iarc.fr>. Access date 20.10.2017]
5. Spencer, E.A., Key, T.J., Appleby, P.N., Dahm, C.C., Keogh, R.H., Fentiman, I.S., Akbaraly, T., Brunner, E.J., Burley, V., Cade, J.E., Greenwood, D.C., Stephen, A.M., Mishra, G., Kuh, D., Luben, R., Mulligan, A.A., Khaw, K. — T., Rodwell, S.A. (2010). Meat, poultry and fish and risk of colorectal cancer: Pooled analysis of data from the UK dietary cohort consortium. *Cancer Causes and Control*, 21(9), 1417–1425.
6. Processed meat and cancer: what you need to know [Электронный ресурс: <http://scienceblog.cancerresearchuk.org/2015/10/26/processed-meat-and-cancer-what-you-need-to-know/>. Дата обращения 20.10.2017]
7. The Wisconsin Meat Industry Hall of Fame [Электронный ресурс: http://www.ansci.wisc.edu/Meat_HOF/index.htm. Дата обращения 20.10.2017]
8. Kulikovskii, A.V., Vostrikova, N.I., Tchernukha, I.M., Savtchuk, S.A. (2014). Methodology of the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Foods. *Journal of Analytical Chemistry*, 69(2), 205–209.
9. Пельман, М., Хитцель, А., Швереле, Ф., Шпеер, К., Джера, В. (2012). Стратегии минимизации содержания полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) в копченых мясopодуктах. *Международная научно-практическая конференция, посвященная памяти Василия Матвеевича Горбатова*, 1(1), 33–46.
10. Norat, T., Riboli, E. (2001). Meat consumption and colorectal cancer: A review of epidemiologic evidence. *Nutrition Reviews*, 59(2), 37–47.

11. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. *The EFSA Journal* (2008) 724, 1–114.
12. Commission regulation № 835/2011 // *Official Journal of the European Union* 20.8.2011. L 215/4–8p.
13. Smoked meats cause cancer (the rumour that won't go away) (2006). *Meat International*, Vol. 16, № 9, P.1.5
14. NTP Report on Carcinogens. Selected heterocyclic amines. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Natl. Toxicology Program. Eleventh Edition, 2004, P.135.
15. Bruce, W.R. (1987). Recent hypotheses for the origin of colon cancer. *Cancer Research*, 47(16), 4237–4242.
16. Skog, K.I., Johansson, M.A.E., Jägerstad, M.I. (1998). Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: A review on formation, occurrence and intake. *Food and Chemical Toxicology*, 36(9–10), 879–896.
17. Robbana-Barnat S, Rabache M, Rialland E, Fradin J. (1996). Heterocyclic amines: Occurrence and prevention in cooked food. *Environmental Health Perspectives*, 104(3), 280–288.
18. Thiébaud, H.P., Knize, M.G., Kuzmicky, P.A., Hsieh, D.P., Felton, J.S. (1995). Airborne mutagens produced by frying beef, pork, and a soy-based food. *Food and Chemical Toxicology*, 33(10), 821–828.
19. Sinha, R. Rothman, N. Salmon, C.P. Mark, S.D. Brown, E.D. Levander, O.A. Knize, M.G. Swanson, C.A. Felton, J.S. Rossi, S. (1995). High Concentrations of the carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]pyridine (PhIP) occur in chicken but are dependent on the cooking method. *Cancer Research*, 55(20), 4516–4519.
20. Jagerstad, M, Skog, K, Grivas, S, Olsson, K. (1991). Formation of heterocyclic amines using model systems. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 259(3–4), 219–233.
21. IARC monographs of the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. World Health Organization. Intl. Agency for Research on Cancer. 1993, V.56.Lyon.
22. Murtaugh, M.A., Ma, K. – N., Sweeney, C., Caan, B.J., Slattery, M.L. (2004). Meat Consumption patterns and preparation, genetic variants of metabolic enzymes, and their association with rectal cancer in men and women. *Journal of Nutrition*, 134(4), 776–784.
23. Gibis, M. (2007). Occurrence of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in fried patties of different animal species. *Proceedings of the 53th International Congress of Meat Science and Technology*, China, P.13.
24. Sinha, R., Rothman, N., Brown, E.D., Mark, S.D., Hoover, R.N., Caporaso, N.E., Levander, O.A., Knize, M.G., Lang, N.P., Kadlubar, F.F. (1994). Pan-fried meat containing high levels of heterocyclic aromatic amines but low levels of polycyclic aromatic hydrocarbons induces cytochrome P4501A2 activity in humans. *Cancer Research*, 54(23), 6154–6159.
25. Alaejos, M.S., Afonso, A.M. (2011) Factors that affect the content of heterocyclic aromatic amines in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(2), 52–108.
26. Forman, D., Bray, F., Brewster, D.H., Gombe Mbalawa, C., Kohler, B., Píceros, M., Steliarova-Foucher, E., Swaminathan, R., Ferlay, J. eds. (2013). Cancer Incidence in Five Continents, Vol. X (electronic version) Lyon, IARC. [Электронный ресурс: <http://ci5.iarc.fr> last accessed on / Access date 12.10.2017]
27. Bray F. Transitions in human development and the global cancer burden. In: Wild CP, Stewart B(Eds) *World Cancer Report 2014* Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2014.
28. Willett, W.C., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Rosner, B.A., Speizer, F.E. (1990). Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *England Journal of Medicine*, 323(24), 1664–1672.
29. Giovannucci, E., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Willett, W.C. (1994). Intake of fat, meat, and fiber in relation to risk of colon cancer in men. *Cancer Research*, 54(9), 2390–2397.
30. Singh, P.N., Fraser, G.E. (1998). Dietary risk factors for colon cancer in a low-risk population. *American Journal of Epidemiology*, 148(8), 761–774.
31. Farvid, M.S., Cho, E., Chen, W.Y., Eliassen, A.H., Willett, W.C. (2014). Dietary protein sources in early adulthood and breast cancer incidence: prospective cohort study. *BMJ (Online)*, 348: g3437.
32. Fraser, G.E. (1999). Associations between diet and cancer, ischemic heart disease, and all-cause mortality in non-Hispanic white California Seventh-day Adventists. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70(suppl), 532S–538S.
33. Ma, R.W., Chapman, K. (2009). A systematic review of the effect of diet in prostate cancer prevention and treatment. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 22(3), 187–199.
34. Chao, A., Thun, M.J., Connell, C.J., et al. (2005). Meat consumption and risk of colorectal cancer. *JAMA*, 293, 172–182.
35. Kojima, M., Wakai, K., Tamakoshi, K., Tokudome, S., Toyoshima, H., Watanabe, Y., Hayakawa, N., Suzuki, K., Hashimoto, S., Ito, Y., Tamakoshi, A. (2004). Diet and colorectal cancer mortality: results from the Japan Collaborative Cohort Study. *Nutrition and Cancer*, 50(1), 23–32.
36. English, D.R., MacInnis, R.J., Hodge, A.M., Hopper, J.L., Haydon, A.M., Giles, G.G. (2004). Red meat, chicken, and fish consumption and risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 13(9), 1509–1514.
37. Wei, E.K., Giovannucci, E., Wu, K., Rosner, B., Fuchs, C.S., Willett, W.C., Colditz, G.A. (2004). Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. *International Journal of Cancer*, 108(3), 433–442.
38. Larsson, S.C., Rafter, J., Holmberg, L., Bergkvist, L., Wolk, A. (2005). Red meat consumption and risk of cancers of the proximal colon, distal colon and rectum: The Swedish Mammography Cohort. *International Journal of Cancer*, 113(5), 829–834.
39. Norat, T., Bingham, S., Ferrari, P., et al. (2005). Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(12), 906–916.
40. Lin, J., Zhang, S.M., Cook, N.R., Lee, I. – M., Buring, J.E. (2004). Dietary fat and fatty acids and risk of colorectal cancer in women. *American Journal of Epidemiology*, 160(10), 1011–1022.
41. Honikel, K. – O. (2009). Too much is always unhealthy: New findings from studies on meat and its health dangers [Allzu viel ist immer ungesund]. *Fleischwirtschaft*, 89(5), 8–9.
42. Key, T.J., Appleby, P.N., Spencer, E.A., Travis, R.C., Allen, N.E., Thorogood, M., Mann, J.I. (2009). Cancer incidence in British vegetarians. *British Journal of Cancer*, 101(1), 192–197.
43. Красное мясо: польза или вред для здоровья? [Электронный ресурс: <http://medbe.ru/news/pitanie-i-diety/krasnoe-myaso-polza-ili-vred-dlya-zdorovya/> Дата обращения 20.10.2017 г.]
44. Hsieh, A.C., Liu, Y., Edlind, M.P., Ingolia, N.T., Janes, M.R., Sher, A., Shi, E.Y., tumpf, C.R., Christensen, C., Bonham, M.J., Wang, S., Ren, P., Martin, M., Jessen, K., Feldman, M.E., Weissman, J.S., Shokat, K.M., Rommel, C., Ruggero, D. (2012). The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. *Nature*, 485(7396), 55–61.
45. Ruggero, D., Montanaro, L., Ma, L., Xu, W., Londei, P., Cordon-Cardo, C., Pandolfi, P.P. (2004). The translation factor eIF-4F promotes tumor formation and cooperates with c-Myc in lymphomagenesis. *Nature Medicine*, 10(5), 484–486.
46. Геннадик, А.Г., Нелаева, А.А. (2010). Роль инсулиноподобного фактора роста-I в метаболизме, регуляции клеточного обновления и процессах старения. *Ожирение и метаболизм*, 2, 10–15.
47. Innovative method to review research on mechanisms by which lifestyle factors cause cancer. [Электронный ресурс: <http://www.wcrf.org/int/research-we-fund/continuous-update-project-cup/mechanisms-research>. Дата обращения 20.10.2017].

REFERENCES

1. Monographs evaluate consumption of red meat and processed meat. [Electronic resource: <http://scienceblog.cancer-researchuk.org/2015/10/26/processed-meat-and-cancer-what-you-need-to-know/IARC>. Access date 15.10.2017 г.]
2. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. Published early online October 26, 2015 in The Lancet Oncology. First author Veronique Bouvard, International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group, Lyon, France. [Electronic resource: <https://www.cancer.org/latest-news/world-health-organization-says-processed-meat-causes-cancer.html#citation/> Access date 15.10.2017 г.]
3. Chan, D.S.M., Lau, R., Aune, D., Vieira, R., Greenwood, D.C., Kampman, E., Norat, T. (2011). Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PLoS ONE*, 6(6), № article e20456
4. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F. GLOBOCAN2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC

- CancerBase No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. [Electronic resource: <http://globocan.iarc.fr>. Access date 20.10.2017]
5. Spencer, E.A., Key, T.J., Appleby, P.N., Dahm, C.C., Keogh, R.H., Fentiman, I.S., Akbaraly, T., Brunner, E.J., Burley, V., Cade, J.E., Greenwood, D.C., Stephen, A.M., Mishra, G., Kuh, D., Luben, R., Mulligan, A.A., Khaw, K. — T., Rodwell, S.A. (2010). Meat, poultry and fish and risk of colorectal cancer: Pooled analysis of data from the UK dietary cohort consortium. *Cancer Causes and Control*, 21(9), 1417–1425.
 6. Processed meat and cancer — what you need to know [Electronic resource: <http://scienceblog.cancerresearchuk.org/2015/10/26/processed-meat-and-cancer-what-you-need-to-know/>. Access date 20.10.2017]
 7. The Wisconsin Meat Industry Hall of Fame [Electronic resource: http://www.ansci.wisc.edu/Meat_HOF/index.htm. Access date 20.10.2017]
 8. Kulikovskii, A.V., Vostrikova, N.L., Tchernukha, I.M., Savtchuk, S.A. (2014) Methodology of the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Foods. *Journal of Analytical Chemistry*, 69(2), 205–209.
 9. Pöhlmann, M., Hitzel, A., Schwägele, F., Speer, K., Jira, W. (2012). Strategien zur Minimierung von polyzyklischen aromatischen kohlenwasserstoffen (PAK) in geräucherten fleischerzeugnissen. International scientific and practical conference dedicated to the memory of Vasily Matveyevich Gorbato1(1), 33–46. (in Russian).
 10. Norat, T., Riboli, E. (2001). Meat consumption and colorectal cancer: A review of epidemiologic evidence. *Nutrition Reviews*, 59(2), 37–47.
 11. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. *The EFSA Journal* (2008) 724, 1–114.
 12. Commission regulation № 835/2011 // *Official Journal of the European Union* 20.8.2011. L 215/4–8 p.
 13. Smoked meats cause cancer (the rumour that won't go away) (2006). *Meat International*, Vol. 16, № 9, P. 1.5
 14. NTP Report on Carcinogens. Selected heterocyclic amines. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Natl. Toxicology Program. Eleventh Edition, 2004, P.135.
 15. Bruce, W.R. (1987). Recent hypotheses for the origin of colon cancer. *Cancer Research*, 47(16), 4237–4242.
 16. Skog, K.I., Johansson, M.A.E., Jägerstad, M.I. (1998). Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: A review on formation, occurrence and intake. *Food and Chemical Toxicology*, 36(9–10), 879–896.
 17. Robbana-Barnat S., Rabache M., Rialland E., Fradin J. (1996). Heterocyclic amines: Occurrence and prevention in cooked food. *Environmental Health Perspectives*, 104(3), 280–288.
 18. Thiébaud, H.P., Knize, M.G., Kuzmicky, P.A., Hsieh, D.P., Felton, J.S. (1995). Airborne mutagens produced by frying beef, pork, and a soy-based food. *Food and Chemical Toxicology*, 33(10), 821–828.
 19. Sinha, R., Rothman, N., Salmon, C.P., Mark, S.D., Brown, E.D., Levander, O.A., Knize, M.G., Swanson, C.A., Felton, J.S., Rossi, S. (1995). High concentrations of the carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) occur in chicken but are dependent on the cooking method. *Cancer Research*, 55(20), 4516–4519.
 20. Jagerstad, M., Skog, K., Grivas, S., Olsson, K. (1991). Formation of heterocyclic amines using model systems. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 259(3–4), 219–233.
 21. IARC monographs of the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. World Health Organization. Intl. Agency for Research on Cancer. 1993, V.56.Lyon.
 22. Murtaugh, M.A., Ma, K. — N., Sweeney, C., Caan, B.J., Slattery, M.L. (2004). Meat Consumption patterns and preparation, genetic variants of metabolic enzymes, and their association with rectal cancer in men and women. *Journal of Nutrition*, 134(4), 776–784.
 23. Gibis, M. (2007). Occurrence of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in fried patties of different animal species. *Proceedings of the 53th International Congress of Meat Science and Technology*, China, P. 13.
 24. Sinha, R., Rothman, N., Brown, E.D., Mark, S.D., Hoover, R.N., Caporaso, N.E., Levander, O.A., Knize, M.G., Lang, N.P., Kadlubar, F.F. (1994). Pan-fried meat containing high levels of heterocyclic aromatic amines but low levels of polycyclic aromatic hydrocarbons induces cytochrome P4501A2 activity in humans. *Cancer Research*, 54(23), 6154–6159.
 25. Alaejos, M.S., Afonso, A.M. (2011) Factors that affect the content of heterocyclic aromatic amines in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(2), 52–108.
 26. Forman, D., Bray, F., Brewster, D.H., Gombe Mbalawa, C., Kohler, B., Píceros, M., Steliarova-Foucher, E., Swaminathan, R., Ferlay, J. eds. (2013). *Cancer Incidence in Five Continents, Vol. X* (electronic version) Lyon, IARC. [Электронный ресурс: <http://ci5.iarc.fr> last accessed on / Access date 12.10.2017]
 27. Bray F. Transitions in human development and the global cancer burden. In: Wild CP, Stewart B(Eds) *World Cancer Report 2014* Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2014.
 28. Willett, W.C., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Rosner, B.A., Speizer, F.E. (1990). Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *England Journal of Medicine*, 323(24), 1664–1672.
 29. Giovannucci, E., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Willett, W.C. (1994). Intake of fat, meat, and fiber in relation to risk of colon cancer in men. *Cancer Research*, 54(9), 2390–2397.
 30. Singh, P.N., Fraser, G.E. (1998). Dietary risk factors for colon cancer in a low-risk population. *American Journal of Epidemiology*, 148(8), 761–774.
 31. Farvid, M.S., Cho, E., Chen, W.Y., Eliassen, A.H., Willett, W.C. (2014). Dietary protein sources in early adulthood and breast cancer incidence: prospective cohort study. *BMJ (Online)*, 348: g3437.
 32. Fraser, G.E. (1999). Associations between diet and cancer, ischemic heart disease, and all-cause mortality in non-Hispanic white California Seventh-day Adventists. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70(suppl), 532S–538S.
 33. Ma, R.W., Chapman, K. (2009). A systematic review of the effect of diet in prostate cancer prevention and treatment. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 22(3), 187–199
 34. Chao, A., Thun, M.J., Connell, C.J., et al. (2005). Meat consumption and risk of colorectal cancer. *JAMA*, 293, 172–182.
 35. Kojima, M., Wakai, K., Tamakoshi, K., Tokudome, S., Toyoshima, H., Watanabe, Y., Hayakawa, N., Suzuki, K., Hashimoto, S., Ito, Y., Tamakoshi, A. (2004). Diet and colorectal cancer mortality: results from the Japan Collaborative Cohort Study. *Nutrition and Cancer*, 50(1), 23–32.
 36. English, D.R., MacInnis, R.J., Hodge, A.M., Hopper, J.L., Haydon, A.M., Giles, G.G. (2004). Red meat, chicken, and fish consumption and risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 13(9), 1509–1514.
 37. Wei, E.K., Giovannucci, E., Wu, K., Rosner, B., Fuchs, C.S., Willett, W.C., Colditz, G.A. (2004). Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. *International Journal of Cancer*, 108(3), 433–442.
 38. Larsson, S.C., Rafter, J., Holmberg, L., Bergkvist, L., Wolk, A. (2005). Red meat consumption and risk of cancers of the proximal colon, distal colon and rectum: The Swedish Mammography Cohort. *International Journal of Cancer*, 113(5), 829–834.
 39. Norat, T., Bingham, S., Ferrari, P., et al. (2005). Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(12), 906–916.
 40. Lin, J., Zhang, S.M., Cook, N.R., Lee, I. — M., Buring, J.E. (2004). Dietary fat and fatty acids and risk of colorectal cancer in women. *American Journal of Epidemiology*, 160(10), 1011–1022.
 41. Honikel, K. — O. (2009). Too much is always unhealthy: New findings from studies on meat and its health dangers [Allzu viel ist immer ungesund]. *Fleischwirtschaft*, 89(5), 8–9.
 42. Key, T.J., Appleby, P.N., Spencer, E.A., Travis, R.C., Allen, N.E., Thorogood, M., Mann, J.I. (2009). Cancer incidence in British vegetarians. *British Journal of Cancer*, 101(1), 192–197.
 43. Red meat: benefit or harm to health? [Electronic resource: <http://medbe.ru/news/pitanie-i-diety/krasnoe-myaso-polza-ili-vred-dlya-zdorovya/> Access date 20.10.2017 r.]
 44. Hsieh, A.C., Liu, Y., Edlind, M.P., Ingolia, N.T., Janes, M.R., Sher, A., Shi, E.Y., Stumpf, C.R., Christensen, C., Bonham, M.J., Wang, S., Ren, P., Martin, M., Jessen, K., Feldman, M.E., Weissman, J.S., Shokat, K.M., Rommel, C., Ruggero, D. (2012). The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. *Nature*, 485(7396), 55–61.
 45. Ruggero, D., Montanaro, L., Ma, L., Xu, W., Londei, P., Cordon-Cardo, C., Pandolfi, P.P. (2004). The translation factor eIF-4F promotes tumor formation and cooperates with c-Myc in lymphomagenesis. *Nature Medicine*, 10(5), 484–486.
 46. Gennadinik, A.G., Nelaeva, A.A. (2010). The role of insulin-like growth factor-I in metabolism, regulation of cellular renewal and aging processes. *Obesity and Metabolism*, 2, 10–15.
 47. Innovative method to review research on mechanisms by which lifestyle factors cause cancer. [Electronic resource: <http://www.wcrf.org/int/research-we-fund/continuous-update-project-cup/mechanisms-research>. Access date 20.10.2017]

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
*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: ok@vniimp.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: kulikovsky87@gmail.com

Минаев Михаил Юрьевич — кандидат технических наук, руководитель ПЦР направления, 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

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 16.11.2017

AUTHOR INFORMATION

Affiliation

Natal'ya L. Vostrikova — candidate of technical sciences, head of laboratory
«Scientific and methodical work, biological and analytical research», V.M. Gorbатов 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
*corresponding author

Oksana A. Kuznetsova — doctor of technical sciences, director, V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences
109316, Moscow, Talalikhina str., 26
Tel.: +7-495-676-72-11
E-mail: ok@vniimp.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. 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: a.kulikovskii@fncps.ru

Mikhail Yu. Minaev — candidate of technical sciences, a head of the Molecular diagnostic division, 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: m.minaev@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 16.11.2017

НАУЧНЫЙ ПОДХОД К ОПРЕДЕЛЕНИЮ СОРТА МЯСА ПТИЦЫ И ПТИЦЕПРОДУКТОВ

Махонина В.Н.*, Агафонов В.П.

«Всероссийский научно-исследовательский институт птицеперерабатывающей промышленности» — филиал
Федерального научного центра «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства»
Российской академии наук, п. Ржавки, Московская область

Ключевые слова: тушка птицы, кусковое мясо, объективные индексы качества, белок мышечный и соединительнотканый, пищевая ценность, сорт мяса и птицепродуктов, метод определения сорта.

Аннотация

Предложена система классификации мяса птицы по сортам, учитывающая оценку отдельных мясокостных и бескостных кусков, а также измельченного мяса по объективным индексам качества, а именно по соотношению массовой доли жира и массовой доле белка, по показателю качества белка (отношению триптофана к оксипролину), коэффициенту энергетической ценности и другим показателям, установленным для сухопутной и водо-плавающей птицы и сопоставимым с аналогичными показателями для говядины и свинины. Приведены количественные критерии оценки качества мяса птицы по содержанию мышечной, соединительной и жировой тканей (кожи с жиром) в потрошеной тушке и ее отдельных частях, установлен их выход и коэффициенты потребительской стоимости (КПС). Дана сравнительная оценка биологической ценности мясного сырья убойных животных и птицы, мяса птицы механической обвалки и пищевых добавок животного и растительного происхождения. Установлено, что мясо птицы механической обвалки по функционально-технологическим свойствам и биологической ценности значительно превосходит животные и растительные белки. Биологическая ценность кускового мяса цыплят-бройлеров и кур яичного направления 1 сорта имеет значения 73,12 и 72,92 %, в тоже время биологическая ценность гусиного мяса от потрошенных тушек 2 и 1 сорта имеет высокие значения и изменяется от 79,77 до 81,14 %. Новый подход к определению сорта мяса птицы и птицепродуктов способствует увеличению ассортимента данных продуктов питания с допуском в рецептуры колбасных фаршей нетрадиционных источников сырья животного и растительного происхождения, адекватных и сбалансированных по белковому составу, что является определенным вкладом в решение задачи обеспечения населения готовыми изделиями высокого качества и повышения эффективности производства.

Original scientific paper

THE SCIENTIFIC APPROACH OF DETERMINATION POULTRY GRADE AND POULTRY PRODUCTS

Valentina N. Makhonina*, Valerij P. Agafonychev

«All-Russian Scientific Research Institute of Poultry Processing Industry» — Branch of the Federal State
Budget Scientific Institution Federal Scientific Center «All-Russian Research and Technological Poultry Institute»
of Russian Academy of Sciences, Rzhavki, Moscow region

Key words: the poultry carcass, lump meat, the objective quality indexes, muscle and connective tissue protein, nutritional value, grade of meat and poultry products, the method of determining grades.

Abstract

There was proposed the system of classification of poultry by grades, taking into account the rate of individual bone-in and boneless pieces, and minced meat according to objective quality indexes, namely the ratio of the mass fraction of fat and mass fraction of protein in terms of protein quality (ratio of tryptophan to hydroxyproline), the ratio of the energy value and other indicators established for land and water-floating bird and is comparable to similar measures for beef and pork. Was given the quantitative criteria for rating the quality of poultry meat for content of muscle, connective and fatty tissues (skin with fat) in gutted carcass and its parts, installed there output and factors consumer value (FCV). Also was given the comparative rate of biological value of raw meat of slaughter animals and poultry, poultry meat mechanically deboning and nutritional supplements of animal and vegetable origin. It is established, that poultry meat mechanically separated on the functional-technological properties and bioavailability significantly superior to animal and vegetable proteins. The biological value of the lump meat of chickens-broilers and hens egg directions 1 grade has values 73.12 and 72.92 %, the same time the biological value of goose meat from deboning carcasses of 2 and 1 grades has high values and varies from 79.77 to 81.14 %. The new approach of the definition types of meat poultry and poultry products increases the range of foods allowed by the introduction in the recipe of sausage stuffing alternative sources of raw materials of animal and vegetable origin, adequate and balanced protein composition that is a definite contribution to the solution of the problem of providing the population with goods of high quality and enhance production efficiency.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Махонина В.Н., Агафонов В.П. Научный подход к определению сорта мяса птицы и птицепродуктов. Теория и практика переработки мяса. 2017;2(4):114–128. DOI:10.21323/2414-438X-2017-2-4-114-128

FOR CITATION: Makhonina V.N., Agafonychev V.P. The scientific approach of determination poultry grade and poultry products. Theory and practice of meat processing. 2017;2(4):114–128. (In Russ.) DOI:10.21323/2414-438X-2017-2-4-114-128

Введение

Анализ публикаций по актуальной проблеме увеличения объемов производства мясо-птицепроductов обуславливает необходимость определения их сорта.

При промышленной переработке сельскохозяйственной птицы получают мясное сырье — потрошенные тушки, обработанные жир и субпродукты (шеи с кожей или без нее, потроха — сердце, печень, мышечный желудок без содержимого и кутикулы), комплект костей с остаточной прирезью мышечной и соединительной тканей), вторичное сырье (головы, ноги), которые подвергают дополнительной обработке по разработанным и утвержденным нормативным и техническим документам (Н и ТД). При разделке и обвалке потрошенных тушек и ее частей, осуществляемой в соответствии с международными стандартами ЕЭК ООН [1, 2, 3] и гармонизированными национальными стандартами различных видов птицы, выделяют кусковое мясо от грудной части, окорочков, крыльев и спинки, а из комплекта костей с остаточной прирезью — мясо птицы механической обвалки (МПО).

В Российской Федерации обвалку потрошенных тушек и ее частей осуществляют по принятой схеме (Рис. 1)

Количественные критерии оценки качества мяса птицы на примере потрошенных тушек кур яичного направления по содержанию мышечной, соединитель-

ной и жировой тканей (кожи с жиром) в потрошенной тушке и ее отдельных частях, установленный их выход и коэффициенты потребительской стоимости (КПС) приведены в разработанных во ВНИИПП справочниках по технологии разделки, обвалки и жиловки основных видов промышленно перерабатываемой сельскохозяйственной птицы, при этом в Табл. 1 отражены не только мясокостное, но и бескостное кусковое с кожей и без нее, что позволило определить сортность мяса и пищевых субпродуктов.

Результаты исследований определения сортности отдельных видов сырья из мяса птицы приведены в опубликованных работах [4, 5].

Цель настоящей работы — определить выход отдельных частей потрошенных тушек птицы и разработать систему классификации мяса птицы по сортам, установить биологическую ценность (БЦ) отдельных мясокостных и бескостных кусков, измельченного мяса (мяса птицы механической обвалки — МПО), потрохов, комплекта костей и пищевых компонентов животного и растительного происхождения.

Материалы и методы

Качество мяса и мясopодуктов в значительной степени определяется морфологическим (выходом) и химическим составом отдельных частей и тканей, поэтому процесс обвалки и разделения мяса по сор-

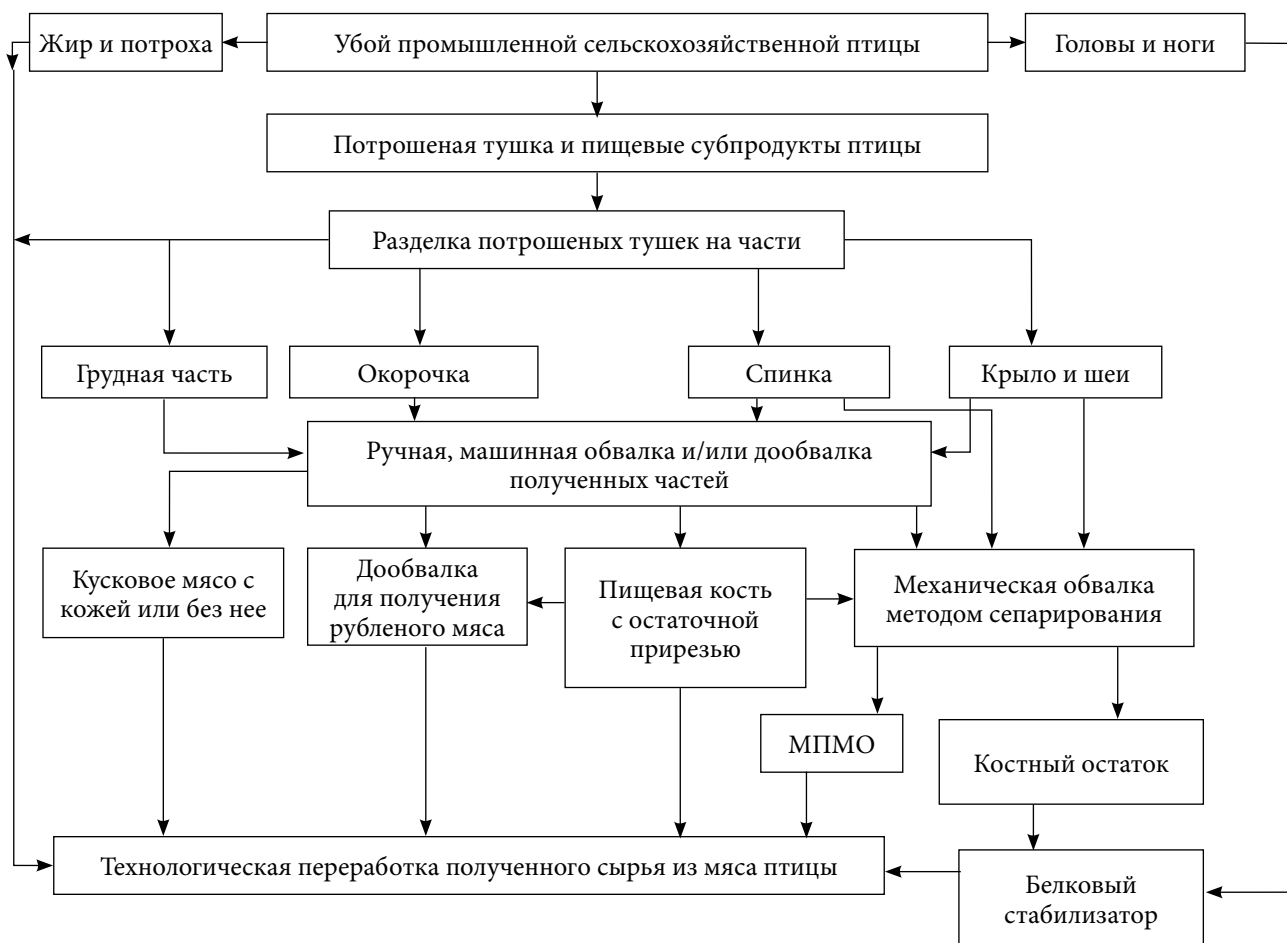


Рис. 1. Схема разделки и обвалки потрошенных тушек с использованием получаемых продуктов убоя птицы

Таблица 1. Нормативы выхода и коэффициенты потребительской стоимости (КПС) частей тушек

Коды	Наименование части	Масса тушки, г					
		цыплята		молодки		несушки	
		600±100		800±100		800±100	
		%	КПС	%	КПС	%	КПС
0601	Грудка с ребрами и малым филе (грудная часть — мясо на кости)	23,5	1,34	24,5	1,34	23,6	1,41
	в т.ч. обваленная грудка с малым филе (мясо бескостное с кожей грудки)	17,1	1,51	21,1	1,63	20,7	1,65
0603	Обваленная грудка без малого филе (большое филе тушки птицы с реберным мясом)	13,50	1,74	16,90	1,90	17,15	2,04
0604	Обваленная грудка с малым филе (филе тушки птицы — мясо жилованное)	13,9	2,01	19,0	2,02	18,6	2,04
0605, 0704	Обваленная грудка без малого филе (большое филе)	9,6	2,02	14,0	2,20	13,7	2,23
1001	Окорочок	33,8	1,19	35,7	1,27	31,0	1,32
	в т.ч. обваленный бескостный окорочок (красное мясо с кожей окорочка)	27,1	1,32	27,2	1,34	27,0	1,39
	в т.ч. обваленный жилованный окорочок (красное мясо окорочка)	23,1	1,40	24,0	1,47	23,8	1,53
0102	Тушка потрошенная (ТП)	100,0	1,0	100,0	1,0	100,0	
	в т.ч. обваленная жилованная потрошенная тушка (мясо потрошенной тушки)	53,2		59,3		61,4	
	в т.ч. обваленная бескостная потрошенная тушка (мясо с кожей потрошенной тушки)	74,3		73,0		75,2	
	в т.ч. жир абдоминальный	—		—		—	
	в т.ч. обваленная бескостная потрошенная тушка с абдоминальным жиром (мясо с кожей и абдоминальным жиром потрошенной тушки)	74,3		73,0		75,2	
	в т.ч. прирезь кости	1,2		2,3		5,0	
	в т.ч. обваленная бескостная потрошенная тушка с абдоминальным жиром и прирезью (мясо с кожей, абдоминальным жиром и прирезью потрошенной тушки)	75,5		75,3		80,2	
	в т.ч. кости без прирезки	24,5		24,7		19,8	
	Коэффициент потребительской стоимости тушки		1,00		1,00		1,065

там сухопутной птицы осуществляют по действующему в мясной промышленности методу сортировки (жиловки) говядины в зависимости от содержания в ней видимых фрагментов мышечной, соединительной и жировой тканей, а сортировку (жиловку) мяса водоплавающей птицы — по содержанию фрагментов мышечной ткани, кожи с подкожным и абдоминальным жиром сравнивают с данными, полученными при обвалке и сортировке свинины третьей категории упитанности (жирной). Морфологический состав определяли разделкой, обвалкой и жиловкой не менее трех потрошенных тушек и отдельных частей птицы при трех повторностях для различных весовых групп методом препарирования с анатомической зачисткой комплекта костей, а химический состав — по стандартным методикам.

Оценку сырья и мясо-птицепроductов определяют методом квалитметрии, позволяющим оценивать их качество как совокупность отдельных потребительских свойств, при этом важнейшим показателем является массовая доля полноценного белка, содержащего все незаменимые аминокислоты, если она мала, то белковый компонент характеризуется низкой биологической ценностью (БЦ). Для полного усвоения белка пищи содержание в нем аминокислот должно быть сбалансированным, недостаток даже одной незаменимой аминокислоты (НАК) ухудшает использование других [6]. Белки высокой БЦ отличаются сбалансированностью аминокислот, легкой перевариваемостью и хорошей усвояемостью.

Расчеты показателей биологической ценности (БЦ) проведены согласно исследований Н.Н. Липатова и А.М. Бражникова по аминокислотному скору относительно идеального белка по шкале ФАО/ВОЗ, коэффициенту различия аминокислотного состава — КРАС, показателю утилитарности аминокислотного состава (U), показателю сопоставимой избыточности аминокислот σ_c [7, 8, 9, 10]. При этом биологическую ценность белка определяют по формуле: БЦ = 100 – КРАС, %.

Коэффициент утилитарности j -й незаменимой аминокислоты (доли единицы) рассчитывали по формуле:

$$a_j = C_{\min}/C_j$$

где C_j — скор j -й незаменимой аминокислоты по отношению к физиологически необходимой по норме (эталону), %;
 $C_j = (A_j/A_{aj})$ здесь A_j — содержание j -й незаменимой аминокислоты в продукте, г/100 г белка;
 A_{aj} — содержание j -й НАК, соответствующее физиологически необходимой норме (эталону), г/100 г белка.

Коэффициент утилитарности j -й незаменимой аминокислоты используют для расчета коэффициента утилитарности аминокислотного состава (U), который является численной характеристикой, достаточно полно отражающей сбалансированность аминокислот по отношению к эталону:

$$U = \frac{\sum_{j=1}^k (A_j a_j)}{\sum_{j=1}^k A_j}$$

Общее количество незаменимых аминокислот (НАК) в белке оцениваемого продукта, которое из-за

несбалансированности не может быть утилизировано организмом (коэффициент сопоставимой избыточности) определяется по формуле: $\sigma_c = \sigma_n / C_{\min}$,

$$\sigma_n = \sum_{j=1}^k (A_j - C_{\min} A_{sj})$$

Некоторые исследователи считают, что дополнительным объективным показателем оптимальной сбалансированности белка в продукте является коэффициент отношения метионина к цистину эталонного и опытного продуктов, при этом чем выше данный коэффициент, тем оптимальнее сбалансированность его аминокислотного состава [11, 12].

Статистическая обработка экспериментальных результатов была проведена с помощью методов математической статистики. Для статистической обработки экспериментальных данных и построения графических зависимостей использовалась стандартная программа Excel XP for Windows XP. Для каждого образца проводился анализ трех идентичных проб и вычислялись средние значения и доверительные границы случайной погрешности измерений (уровень доверительной вероятности 0,95) по ISO 2602:1980 «Statistical interpretation of test results — Estimation of the mean — Confidence interval».

Результаты и обсуждение

Результаты исследований по сравнению биологической ценности отечественного и импортного мясного сырья убойных животных и птицы свидетельствуют, что самая высокая БЦ и сбалансированность аминокислотного состава характерна для говядины, баранины, конины и свинины, произведенных в период до 1990 г. В настоящее время БЦ импортной и отечественной говядины и свинины при интенсивном стойловом способе выращивания и откорма имеет более низкие значения, что свидетельствует, по-видимому, о более интенсивном способе откорма — выгульный до 1990 г. и стойловый в настоящее время (Табл. 2).

Биологическая ценность мяса птицы, особенно гусиного, от потрошенных тушек 2 и 1 сорта имеет достаточно высокие значения и объясняется особенностями выгульного и напольного способов содержания и откорма водоплавающей и клеточного — сухопутной птицы, что, по-видимому, улучшает сбалансированность НАК белков этого мяса.

Грудные мышцы сухопутной птицы практически не имеют видимых включений соединительной и жировой тканей, при этом содержание внутримышечных белков в соединительной ткани не превышает 5%. Цвет этих мышц — от белого (особенно после варки) до розоватого — является их основным отличительным признаком.

Мясо окорочков сухопутной птицы характеризуется достаточно высоким содержанием белка (17–23%) и меньшим — жира (от 3 до 18%), массовая доля кожи составляет 11,5–17,5%, а максимальное количество

подкожного жира-сырца, полученного методом препарирования, не превышает 5% у цыплят-бройлеров и 8% у кур-несушек.

В настоящее время из водоплавающей птицы на переработку поступают преимущественно утята (менее жирные по сравнению со взрослой птицей), имеющие кожу с пониженным уровнем подкожного жира и повышенное (в среднем на 4%) содержание мышечной ткани [13, 14].

Проведенными работами установлено, что выход мышечной ткани грудной части (филе) утят не превышает 8,7%, а уток — 13,6%, при этом массовая доля внутримышечного жира в грудной части утят и уток составляет менее 5,15%.

Отмечено, что по химическому составу мякотные ткани грудной части утят и уток имеют повышенную массовую долю жира по сравнению с мясом окорочков, этот показатель, определяемый стандартным методом, имел меньшее значение по сравнению с аналогичным, полученным методом препарирования (жиловкой), что является характерным отличием по сравнению с данными, полученными для жилованной свинины [15].

Некоторые исследователи [16, 17] в своих работах необоснованно предъявляют претензии к качеству мясного сырья птицы, в том числе к мясу механической обвалки, предполагая, что оно имеет более низкую биологическую ценность по сравнению белками животного и растительного происхождения, содержащиеся в продуктах переработки свиной шкурки, молока, сои и различных круп, которые используют при количественном недостатке тех или иных нутриентов в готовых изделиях.

Анализ данных, приведенных в статье [18] по изменению состава НАК животных белков, полученных из свиной шкурки и/или говяжьего коллагенсодержащего сырья, также показывает значительное колебание содержания НАК, например, по триптофану, валину, лейцину и др., что не позволяет определить БЦ и другие показатели сбалансированности аминокислотного состава анализируемого животного белка.

В опубликованных работах отечественных исследователей [19, 21] БЦ казеината натрия, пшеничного зерна и крупы рисовой находятся почти на одинаковом уровне, при этом рисовая мука мелкого помола обладает высокой способностью к гелеобразованию, особенно при производстве вареных колбас и полуфабрикатов, а мука, обработанная ИК-излучением и полученная методом термопластической экструзии, имеет высокую водосвязывающую, жиросвязывающую (жироудерживающую), эмульгирующую и гелеобразующую способности, не уступающим по этим показателям соевым белковым изолятам.

Вызывает удивление факт более высокой БЦ обезжиренной соевой муки и соевого концентрата по сравнению с аналогичными показателями белков

Таблица 2. Сравнительная оценка биологической ценности мясного сырья убойных животных и птицы, МПМО и пищевых добавок животного и растительного происхождения

№ п/п	Наименование белоксодержащего сырья	Наименование показателя						мет: цис =3,167; мет: цис НАК÷ ФАО/ВОЗ
		БЦ	коэффициенты		НАК		отношен мет: цис	
			U	σ_c	метион	цистин		
1	Говядина	86,83	0,873	5,236	2,42	1,14	2,123	0,670
2	Баранина	85,25	0,881	4,877	2,30	1,28	1,797	0,567
3	Конина	82,26	0,835	7,100	2,36	1,10	2,146	0,677
4	Свинина	80,31	0,846	6,550	2,41	1,34	1,799	0,568
5	Говядина импортная	75,24	0,792	9,435	1,85	1,26	1,468	0,464
6	Свинина импортная	70,42	0,762	11,231	2,29	1,06	2,160	0,682
7	Свинина (РФ)	60,59	0,671	17,631	2,00	0,95	2,105	0,665
8	Говядина (РФ)	58,22	0,659	19,210	1,43	1,09	1,312	0,414
9	Филе ростера (США)	81,64	0,830	7,392	2,54	1,17	2,171	0,686
10	Мясо гусиное 1с	81,14	0,819	7,946	2,60	1,36	1,912	0,604
11	Филе с кожей цыплят-бройлеров (США)	81,11	0,836	7,078	2,70	1,31	2,061	0,651
12	Филе с кожей цыплят-бройлеров (Дания)	80,15	0,826	7,569	2,57	1,03	2,495	0,788
13	Филе кур яичного направления (США)	80,02	0,831	7,367	2,77	1,28	2,164	0,683
14	Филе цыплят-бройлеров (США)	79,95	0,832	7,310	2,60	1,05	2,476	0,782
15	Мясо гусиное 2с	79,77	0,813	8,263	2,47	1,27	1,945	0,614
16	Филе с кожей цыплят-бройлеров (Япония)	79,75	0,839	8,952	2,89	1,41	2,050	0,647
17	Филе цыплят-бройлеров 1с	79,22	0,827	7,510	3,14	1,34	2,343	0,740
19	Мясо бедра с кожей цыплят-бройлеров (США)	77,80	0,787	9,769	2,64	1,11	2,378	0,751
20	Мясо индюшиное 1с	77,52	0,819	7,948	2,46	1,41	1,745	0,551
21	Мясо утиное 1с	77,28	0,781	10,065	2,34	1,10	2,127	0,672
22	Кусковое мясо шей цыплят-бройлеров 1с	76,09	0,807	8,606	3,20	1,36	2,353	0,780
23	Мясо бедра с кожей цыплят-бройлеров (Япония)	76,07	0,789	9,585	2,72	1,17	2,325	0,734
24	Мясо утиное 2с	75,54	0,780	10,389	2,36	1,20	1,967	0,621
25	Мясо бедра цыплят-бройлеров (Япония)	74,92	0,789	9,602	2,82	1,22	2,311	0,730
26	Мясо бедра цыплят-бройлеров (США)	74,02	0,786	10,533	2,86	1,17	2,444	0,772
27	Мясо цыплят-бройлеров 1с	73,12	0,781	10,162	2,63	1,52	1,730	0,546
28	Мясо кур яичного направления 1с	72,92	0,755	11,764	2,62	1,63	1,607	0,508
29	Мясо окорочков цыплят-бройлеров 1с	72,32	0,809	8,750	3,25	1,50	1,667	0,684
30	Филе цыплят-бройлеров (Россия)	71,31	0,792	9,481	1,90	1,80	1,056	0,333
31	Мясо кур мясного направления от родительского стада	67,97	0,755	11,664	2,75	1,58	1,741	0,550
32	Филе перепелов-бройлеров	80,75	0,880	4,740	4,33	1,364	3,174	1,002
33	Мясо бедра перепелов-бройлеров	79,30	0,850	6,260	4,31	1,335	3,228	1,019
34	Мясо от тушек перепелов яичного направления	71,80	0,817	8,053	2,46	2,02	1,218	0,385
35	Сердце перепелов-бройлеров	77,03	0,820	8,150	2,40	0,750	3,200	1,010
36	Печень перепелов-бройлеров	73,00	0,780	10,160	2,187	0,690	3,170	1,001
37	Мышечный желудок перепелов-бройлеров	65,70	0,530	31,300	0,90	0,285	3,158	0,997
38	МПМО от тушек перепелов-бройлеров	87,72	0,900	3,950	2,94	0,933	3,151	0,995
39	МПМО от шей цыплят-бройлеров 1с	76,43	0,818	7,987	3,07	1,45	2,117	0,669
40	МПМО от грудной части индеек 1с	73,60	0,775	10,443	2,41	1,31	1,840	0,581
41	МПМО от спинки индеек 1с	72,55	0,775	10,463	2,51	1,36	1,846	0,583
42	МПМО от спинки цыплят-бройлеров 1с	72,22	0,747	12,152	2,62	1,23	2,130	0,673
43	Белки животные — казеинат	56,26	0,670	17,758	2,60	1,40	1,857	0,586
44	Пищевой соевый обогатитель	50,80	0,557	28,627	1,75	1,31	1,336	0,422
45	Изолят сои	57,81	0,588	25,210	1,70	1,20	1,417	0,447
46	Белок соевый изолированный	58,76	0,646	19,720	2,00	1,50	1,333	0,421
47	Соевый концентрат	64,47	0,701	15,375	2,10	1,50	1,400	0,442
48	Обезжиренная соевая мука	70,77	0,746	12,374	2,20	1,40	1,571	0,496
49	Крупа гречневая	70,21	0,759	11,419	3,92	1,43	2,741	0,866
50	Крупа овсяная «Геркулес»	68,81	0,726	13,587	2,55	1,55	1,645	0,520
51	Пшеничные зерна	55,07	0,534	31,456	2,30	1,24	1,855	0,586
52	Крупа рисовая	50,10	0,581	25,950	3,22	1,43	2,252	0,711
53	Крупа кукурузная	24,68	0,224	—	2,88	0,80	3,600	1,137

пищевого соевого обогатителя [22], изолята сои [23] и соевого изолированного [24]. Это различие в БЦ изученных соевых белков можно объяснить модификацией соевой обезжиренной и полуобезжиренной муки протеолитическими ферментами, действующими на глубинные пептидные связи и расщепляющими белковые молекулы на более мелкие фрагменты, при этом получают гидролизаты с определенным профилем пептидов и наборов аминокислот. Результаты исследований показали, что ферментативная модификация соевой муки позволяет получить концентраты и изоляты с содержанием от 30 до 90 % белка, при этом происходит глубокий гидролиз белков муки, переводя их из нерастворимого в растворимое состояние с получением средне- и низкомолекулярных белков, а также накоплением промежуточных продуктов гидролиза и низкомолекулярных азотсодержащих соединений.

Исследования показали, что содержание аминокислот в % к общему количеству свободных аминокислот в гидролизатах соевой муки, полученных под действием различных ферментных препаратов, содержат одинаковый набор аминокислот, однако их распределение в образцах различно. Именно поэтому, по-видимому, с изменением содержания НАК в соевых концентратах показатель сопоставимой избыточности аминокислот увеличивается в 1,24 раза, в соевых изолятах в 1,59 и 2,05 раза, а в соевом обогатителе в 2,31 раза, что снижает БЦ концентрированных и изолированных белков сои. По функционально-технологическим свойствам и цене эти белки уступают не только мясному сырью, в том числе и МПМО, но и растительным белкам из отечественных круп — гречневой, овсяной и рисовой, поэтому утверждение авторов [16, 17] о том, что некоторые виды белкового сырья, например, МПМО, имеют значительно меньшую БЦ, чем соевые белки, а животные белки из свиной шкурки сбалансированы по аминокислотному составу, не согласуется с полученными результатами исследований отечественных и зарубежных авторов.

Специалисты ВНИИПП предложили систему классификации мяса птицы по сортам, учитывающую оценку отдельных мясокостных и бескостных видов кускового и измельченного мяса по объективным индексам качества, например по отношению массовой доли жира к массовой доле белка, показателю качества белка (отношению триптофана к оксипролину), коэффициенту энергетической ценности и другим показателям, установленным для сухопутной и водоплавающей птицы и сопоставимым с аналогичными показателями для говядины и свинины. Введение количественных критериев оценки качества мяса птицы по содержанию мышечной, соединительной и жировой тканей (кожи с жиром) в потрошеной тушке и ее отдельных частях, установленный их выход и коэффициенты потребительской стоимости (КПС), приведенные в справочниках по технологии разделки, обвалки и жи-

ловки основных видов промышленно перерабатываемой сельскохозяйственной птицы (Табл. 1), позволило применить принципиально новый подход для определения сорта мяса и пищевых субпродуктов.

В зависимости от количества используемого сырья (кускового мяса, МПМО и пищевых субпродуктов) **готовые продукты**, выработанные из мяса сухопутной/водоплавающей птицы подразделяют на следующие сорта:

- **экстра/отборный** — сорт **готового продукта**, при производстве которого в рецептуре предусмотрено кусковое мясо сухопутной/водоплавающей птицы массовой долей не менее 80 %, в том числе мяса грудной части — не менее 50 %;
- **высший/нежирный** — сорт **готового продукта**, при производстве которого в рецептуре предусмотрено кусковое мясо сухопутной/водоплавающей птицы массовой долей не менее 80 %, в том числе кожи с жиром для водоплавающей — не более 30 %;
- **первый/полужирный** — сорт **готового продукта**, при производстве которого в рецептуре предусмотрено кусковое мясо **сухопутной/водоплавающей** птицы массовой долей не менее 51 %, в том числе кожи с жиром для водоплавающей — не более 50 %;
- **второй** — сорт **готового продукта**, при производстве которого в рецептуре предусмотрено мясо **сухопутной** птицы механической обвалки и/или пищевые субпродукты птицы массовой долей не менее 70 %, в том числе кожи с жиром в мясном сырье не более 20 %;
- **односортный** — сорт **готового продукта**, при производстве которого в рецептуре предусмотрено мясо сухопутной/ водоплавающей птицы механической обвалки и/или пищевые субпродукты птицы массовой долей мяса и/или субпродуктов не менее 70 %, в том числе кожи и жира в мясном сырье не более 60 %. К односортному относят мясо, полученное после выделения кускового мяса от грудной части и окорочков потрошеной тушки птицы, при этом комплект пищевых костей имеет остаточную прирезь различных тканей, которую отделяют от них при механической обвалке с получением МПМО, качество которого характеризуют согласно действующего стандарта;
- **третий/жирный** — сорт **готового продукта**, при производстве которого в рецептуре предусмотрено мясо птицы механической обвалки и/или пищевые субпродукты сухопутной/водоплавающей птицы массовой долей не менее 51 %, в том числе кожи с жиром для водоплавающей — более 60 %;
- **фирменный** — сорт **готового продукта**, при производстве которого в рецептуре предусмотрено кусковое мясо сухопутной/водоплавающей птицы массовой долей от 40 % до 51 %, выработанное по оригинальной рецептуре и технологии с учетом национальных, региональных и других особенностей.

При использовании мяса и/или пищевых субпродуктов птицы и убойных животных сорт готового продукта определяют по массовой доле конкретного вида жилованного мяса согласно рецептуры, например, при массовой доле филе 50 % и 30 % жилованной говядины и/или свинины продукт относят к сорту «экстра» или «отборный»; при 50 % мяса окорочков и 30 % жилованной говядины и/или свинины продукт относят к сорту «высший» или «нежирный»; при наличии в рецептуре кускового мяса птицы и жилованного мяса убойных животных с массовой долей 51 % продукт относят к сорту «первый» или «полужирный» и т.д.).

Сорт изделия при одновременном использовании мяса сухопутной и водоплавающей птицы определяют по их суммарной доле в рецептуре конкретного ассортимента наименования.

Результаты исследований положены в основу разработки стандартов вида общих технических условий, а также на конкретные наименования широкого ассортимента готовых птицепродуктов (Рис. 2).

Introduction

The analysis of publications on the topical problem of increase of production volumes of meat-poultry products necessitates the determination of their grade.

The industrial processing of poultry receive raw meat — gutted carcasses, processed offal and fat (neck with or without skin, giblets — heart, liver, gizzard without content and cuticles), set bones with residual excess flesh of muscle and connective tissue), secondary raw materials (head, legs), which are subjected to further processing according to developed and approved regulatory and technical documents (R and TD.). During the cutting and deboning gutted carcasses and there parts, prepared in accordance with international standards of United Nations Economic Commission for Europe (UNECE) [1, 2, 3] and harmonised national standards of various types of poultry, allocate lump meat from the breast, legs, wings and back, and from the set of bones with residual excess flesh — mechanically deboning poultry meat (MDPM).

The deboning of gutted carcasses and parts, in Russian Federation, is carried out according to the accepted scheme (Fig. 1).

There were shown the quantitative criteria for rating the quality of poultry meat on the example of the gutted carcasses of hens egg direction on the content of muscle, connective and fat tissues (skin with fat) in eviscerated carcass and its separate parts, installed there output and coefficients of consumer value (CCV) in developed in VNIIPP reference books of the technology of cutting, deboning and trimming of main industrial processed poultry, while in Table 1 reflects not only bone, but boneless pieces with

Выводы

Внедрение новых технологий производства мясоптицепродуктов на основе новых знаний, современного развития техники и технологии, с учетом национальных особенностей и обеспечения их соответствия международным требованиям обеспечит стимулирование производства высококачественных продуктов различных сортов в широком ассортименте, их приемлемость и устойчивость на отечественном рынке.

Проведена систематизация мясного сырья убойных животных и птицы, некоторых пищевых добавок животного и растительного происхождения по их биологической ценности.

Разработаны стандарты вида общих технических условий, а также на конкретные наименования широкого ассортимента готовых птицепродуктов, основные требования к которым приведены в десяти межгосударственных и национальных стандартах, в том числе на метод определения массовой доли остаточной прирези мышечной ткани.

and without skin, which allowed to determine the grade of meat and edible offal.

There are given research results determine the grade of certain types of raw materials from poultry meat in the published papers [4, 5].

The aim of this work is to determine the separate parts of the gutted carcasses of poultry and to develop a system of classification of poultry by grades, to establish the biological value (BV) of the individual bone-in and boneless pieces, minced meat (mechanically deboning poultry meat (MDPM), giblets, bone sets and food components of animal and vegetable origin.

Materials and methods

The quality of meat and meat products mainly is determined by the morphological (yield) and chemical structure of separate parts and tissues, so the process of boning and separation of meat by grades of land birds is carried out at a current meat industry method of sorting (tendon) beef depending on the content of view fragment of fur, soil and fat tissues, and sorting of (tendon) meat of waterfowl — by the content of fragments of muscular tissue, skin with subcutaneous and abdominal fat compared with the data obtained by trimming and sorting of pork third category of fatness (fat). Morphological composition were determined by cutting, deboning and trimming no less than three gutted carcasses and parts of birds with three replicates for different mass groups by the method of preparation with the anatomical sweep sets bones, and chemical composition according to standard methods.

The rate of raw meat and poultry products is determined by the method of quality control which helps to rate

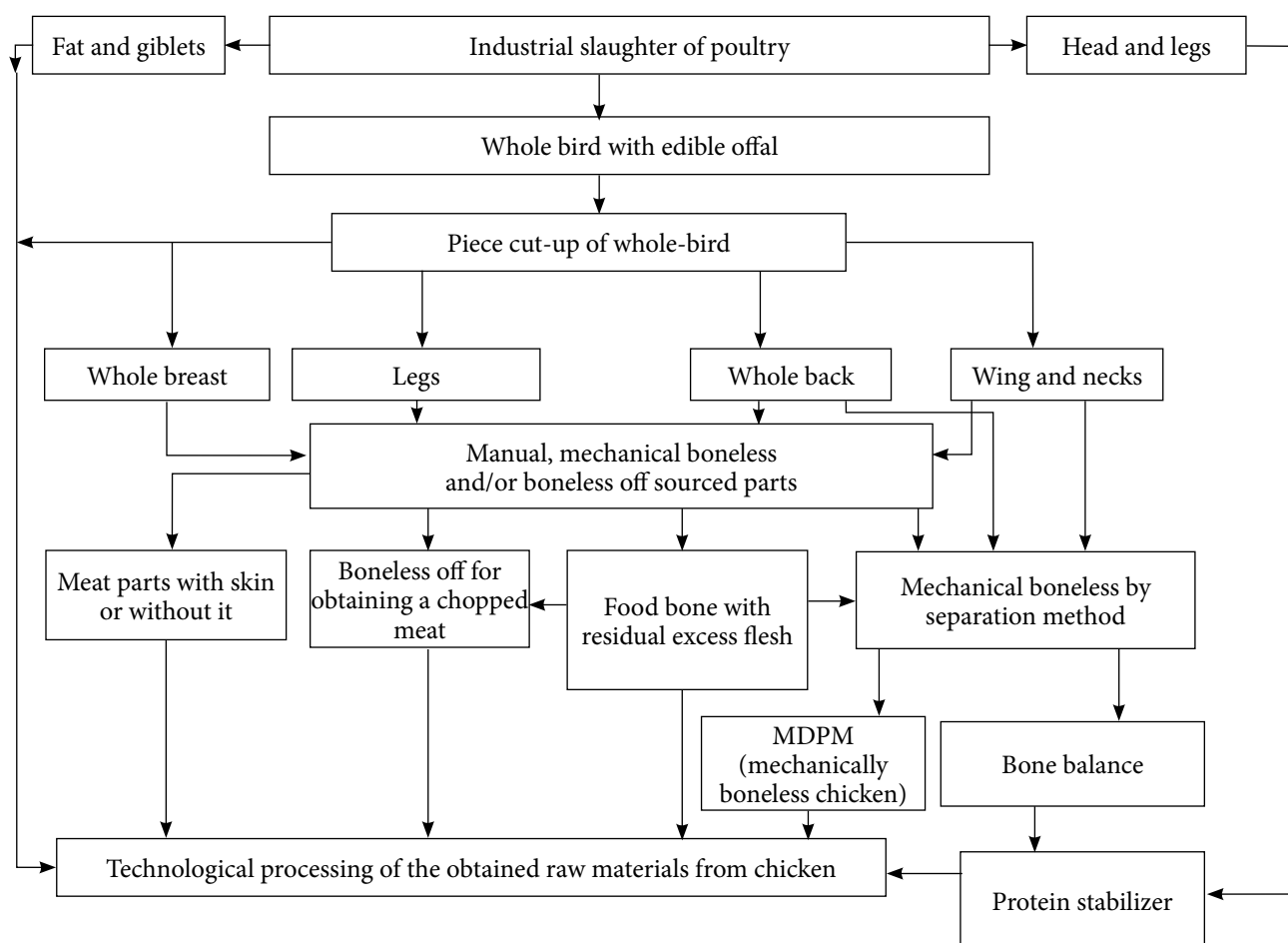


Fig. 1. Scheme of cutting and deboning of gutted carcasses using the resulting products poultry slaughtering

Table 1. Ratios of installed output and coefficients of consumer value (CCV) of carcasses parts

Codes	The name of a part	Carcass weight, g					
		chickens		pullets		hens	
		600±100		800±100		800±100	
		%	CCV	%	CCV	%	CCV
0601	Breast with ribs and small fillet (breast part — meat on the bone)	23,5	1,34	24,5	1,34	23,6	1,41
	including boneless breast with a small fillet (meat boneless with breast skin)	17,1	1,51	21,1	1,63	20,7	1,65
0603	Boneless breast without small fillet (large fillet of poultry carcasses with rib meat)	13,50	1,74	16,90	1,90	17,15	2,04
0604	Boneless breast with a small fillet (fillets of poultry carcasses — the trimmed meat)	13,9	2,01	19,0	2,02	18,6	2,04
0605, 0704	Boneless breast without small fillet (large fillet)	9,6	2,02	14,0	2,20	13,7	2,23
1001	The legs	33,8	1,19	35,7	1,27	31,0	1,32
	including boned boneless chicken (red meat with chicken legs skin)	27,1	1,32	27,2	1,34	27,0	1,39
	including trimmed boneless chicken (red meat chicken legs)	23,1	1,40	24,0	1,47	23,8	1,53
0102	Eviscerated carcass (EC)	100,0	1,0	100,0	1,0	100,0	
	including boned trimmed eviscerated carcass (meat of eviscerated carcass)	53,2		59,3		61,4	
	including boned boneless eviscerated carcass (meat and skin of eviscerated carcass)	74,3		73,0		75,2	
	including abdominal fat	—		—		—	
	including boned boneless eviscerated carcass with abdominal fat (meat with skin and abdominal fat of eviscerated carcass)	74,3		73,0		75,2	
	including bone excess flesh	1,2		2,3		5,0	
	including boned boneless eviscerated carcass with abdominal fat and excess flesh (meat with skin, abdominal fat, and excess flesh of eviscerated carcass)	75,5		75,3		80,2	
	including bone without excess flesh	24,5		24,7		19,8	
	Coefficients of consumer value (CCV)		1,00		1,00		1,065

their quality as a collection of individual properties, here-with the most important indicator is the mass fraction of complete protein, containing all essential amino acids, if it is small, so the protein component is characterized by low biological value (BV). For the complete assimilation of food protein content of amino acids should be balanced, the lack of even one essential amino acid (EAA) impairs the use of other [6]. High biological value (BV) of proteins is differ in the balance of amino acids, easy digestibility and good digestibility.

Calculations of indexes of biological value (BV) according to studies conducted by N. N. Lipatov and A. M. Brazhnikova at the amino acid score of protein with respect to a perfect scale FAO/WHO, the coefficient of difference of amino acid composition — KRAS, the indicator of the utility of amino acid composition (U), indicator comparable redundancy of amino acids σ_c [7–10]. Herewith the biological value of protein determined by the formula: $BV = 100 - KRAS, \%$.

The utility ratio of the j essential amino acids (unit share) was calculated by the formula:

$$a_j = C_{\min} / C_j,$$

where C_j — score j essential amino acids in relation to the physiologically required by the norm (the standard), %;

A_{sj} — content of the j essential amino acid (EAA), corresponding to physiologically necessary norm (the standart g/100 g protein).

The utility index of the j of essential amino acids is used for the calculation of the utility of amino acid composition (U), which is a numerical characteristic, which adequately reflecting the balance of amino acids relative to the standard:

$$U = \frac{\sum_{j=1}^k (A_j a_j)}{\sum_{j=1}^k A_j}$$

The total number of essential amino acids (EAA) in the protein of rating product, which is due to the imbalance cannot be discard by the body (the coefficient comparable redundancy) is determined by the formula:

$$\sigma_c = \sigma_n / C_{\min},$$

$$\sigma_n = \sum_{j=1}^k (A_j - C_{\min} A_{sj})$$

Some researchers consider that an additional objective indicator of the optimum balance of protein in the product is the index of attitude methionine to cystine of standard and experienced products, herewith the higher is this index, the optimal balancing its amino acid structure [11, 12].

Statistic processing of the experimental results was done with using of mathematical statistics methods. There was used the standard program of Excel XP for Windows XP for processing of experimental data on structure and graphical dependency. Also was analyzed three identical samples of each sample and calculated the average values and confidence limits of random measurement errors (level excessively admissibility 0.95) according to ISO 2602:1980

«Statistical interpretation of test results — Estimation of the mean — Confidence interval».

Results and discussion

The results of studies comparing the biological value of domestic and imported raw meat of slaughter animals and poultry are indicating, that the highest biological value (BV) and balanced the importance of amino acid composition characteristic for beef, mutton, horse meat and pork, produced in the period before 1990. For today biological value (BV) of imported and domestic beef and pork stalls under intensive method of growing and fattening has low values, indicating, apparently, more intensive method of fattening — range to 1990, and stabling at present time (Table 2).

The biological value of poultry meat, especially goose, from gutted carcasses 2 and 1 class has a fairly high values and due to the peculiarities backyard and outdoor ways of keeping and fattening waterfowl and cell — land birds, which, apparently, improves the balance of the essential amino acid (EAA) protein of the meat.

Chest muscles of land birds almost have no visible inclusions of connective and fat tissue, herewith intramuscular proteins in the connective tissue does not exceed 5%. The color of these muscles — from white (especially after cooking) to rose — is their main characteristic.

The legs meat of land poultry is characterized by high protein content (17–23%) and less fat (from 3 to 18%), mass fraction of the skin is from 11.5% to 17.5%, and the maximum amount of subcutaneous fat of raw, obtained by the method of preparation, not higher than 5% in broiler and 8% in laying hens.

For today from waterfowl for processing are coming mainly ducklings (less fat in comparison with adult), who have the skin with a reduced level of fat and increased (on average by 4%) content of the muscle tissue [13, 14].

It was established according to conducted works, that muscle tissue of the breast (fillet) of ducklings does not exceed 8.7%, of ducks — 13.6%, while the mass fraction of intramuscular fat in the breast of ducklings and ducks is less than 5.15%.

Noted that the meat tissue of the ducks chest and the ducks have, according to the chemical composition, a high mass fraction of fat compared to the meat of the legs, this figure, determined by the standard method, had less value compared with the same, obtained by the method of preparation (trimming), which is a characteristic difference compared with the data, received for trimmed pork [15].

Some researchers [16, 17] unreasonably make claims in their works to the quality of raw meat and poultry, including meat of mechanical boning, assuming, that it has a lower biological value than proteins of animal and vegetable origin contained in the processed products pork rind, milk, soy and various grits, which are used in the quantitative deficiency of certain nutrients in the finished product.

Table 2. Comparative rate of biological value of raw meat of slaughter animals and poultry, mechanically deboning poultry meat (MDPM) and supplements of animal and vegetable origin

№ п/п	Name protein-containing raw materials	Name of value						methion/ cysteine (FAO/WHO) =3,167; methion/ cysteine EAA÷ FAO/WHO
		BV	Ratio		EAA		ratio methion/ cysteine	
			U	σс	methion	cystine		
1	Beef	86,83	0,873	5,236	2,42	1,14	2,123	0,670
2	Lamb	85,25	0,881	4,877	2,30	1,28	1,797	0,567
3	Horse	82,26	0,835	7,100	2,36	1,10	2,146	0,677
4	Pork	80,31	0,846	6,550	2,41	1,34	1,799	0,568
5	Beef imported	75,24	0,792	9,435	1,85	1,26	1,468	0,464
6	Pork imported	70,42	0,762	11,231	2,29	1,06	2,160	0,682
7	Pork (Russia)	60,59	0,671	17,631	2,00	0,95	2,105	0,665
8	Beef (RF)	58,22	0,659	19,210	1,43	1,09	1,312	0,414
9	Fillet roaster (USA)	81,64	0,830	7,392	2,54	1,17	2,171	0,686
10	Meat goose 1g	81,14	0,819	7,946	2,60	1,36	1,912	0,604
11	Fillet with skin broilers (USA)	81,11	0,836	7,078	2,70	1,31	2,061	0,651
12	Fillet with skin broiler chickens (Denmark)	80,15	0,826	7,569	2,57	1,03	2,495	0,788
13	Fillet hens of egg direction (USA)	80,02	0,831	7,367	2,77	1,28	2,164	0,683
14	Fillet of broiler chickens (USA)	79,95	0,832	7,310	2,60	1,05	2,476	0,782
15	Goose meat 2g	79,77	0,813	8,263	2,47	1,27	1,945	0,614
16	Fillet with skin broiler chickens (Japan)	79,75	0,839	8,952	2,89	1,41	2,050	0,647
17	Fillet of broiler chickens 1C	79,22	0,827	7,510	3,14	1,34	2,343	0,740
19	Meat thigh with skin broiler (USA)	77,80	0,787	9,769	2,64	1,11	2,378	0,751
20	Meat Turkey 1g	77,52	0,819	7,948	2,46	1,41	1,745 .	0,551
21	Meat duck 1s	77,28	0,781	10,065	2,34	1,10	2,127	0,672
22	Shay lump meat broiler 1g	76,09	0,807	8,606	3,20	1,36	2,353	0,780
23	Meat thigh with skin broiler chickens (Japan)	76,07	0,789	9,585	2,72	1,17	2,325	0,734
24	Meat duck 2g	75,54	0,780	10,389	2,36	1,20	1,967	0,621
25	Thigh meat of broiler chickens (Japan)	74,92	0,789	9,602	2,82	1,22	2,311	0,730
26	Thigh meat of broiler chicken (USA)	74,02	0,786	10,533	2,86	1,17	2,444	0,772
27	The meat of broiler chickens 1g	73,12	0,781	10,162	2,63	1,52	1,730	0,546
28	Chicken egg direction 1g	72,92	0,755	11,764	2,62	1,63	1,607	0,508
29	Meat chicken broiler 1g	72,32	0,809	8,750	3,25	1,50	1,667	0,684
30	Fillet of broiler chickens (Russia)	71,31	0,792	9,481	1,90	1,80	1,056	0,333
31	Chicken meat production from parent stock	67,97	0,755	11,664	2,75	1,58	1,741	0,550
32	Fillet quail-broilers	80,75	0,880	4,740	4,33	1,364	3,174	1,002
33	The meat of the thigh quails, broilers	79,30	0,850	6,260	4,31	1,335	3,228	1,019
34	Meat from the carcasses of quail egg direction	71,80	0,817	8,053	2,46	2,02	1,218	0,385
35	The heart quails, broilers	77,03	0,820	8,150	2,40	0,750	3,200	1,010
36	The liver of quails, broilers	73,00	0,780	10,160	2,187	0,690	3,170	1,001
37	The gizzard of quail-chicken	65,70	0,530	31,300	0,90	0,285	3,158	0,997
38	MDPM from carcasses of quails, broilers	87,72	0,900	3,950	2,94	0,933	3,151	0,995
39	MDPM from the necks of chickens-broilers 1g	76,43	0,818	7,987	3,07	1,45	2,117	0,669
40	MDPM from the breast of turkeys 1g	73,60	0,775	10,443	2,41	1,31	1,840	0,581
41	MDPM from the back of turkeys 1g	72,55	0,775	10,463	2,51	1,36	1,846	0,583
42	MDPM from the back of broiler chickens 1g	72,22	0,747	12,152	2,62	1,23	2,130	0,673
43	Protein animals — Caseinate	56,26	0,670	17,758	2,60	1,40	1,857	0,586
44	Food soy dressing	50,80	0,557	28,627	1,75	1,31	1,336	0,422
45	Isolate soy	57,81	0,588	25,210	1,70	1,20	1,417	0,447
46	Soy protein isolated	58,76	0,646	19,720	2,00	1,50	1,333	0,421
47	Soy concentrate	64,47	0,701	15,375	2,10	1,50	1,400	0,442
48	Defatted soy flour	70,77	0,746	12,374	2,20	1,40	1,571	0,496
49	Buckwheat	70,21	0,759	11,419	3,92	1,43	2,741	0,866
50	Oatmeal cereal «Hercules»	68,81	0,726	13,587	2,55	1,55	1,645	0,520
51	Wheat grain	55,07	0,534	31,456	2,30	1,24	1,855	0,586
52	Rice	50,10	0,581	25,950	3,22	1,43	2,252	0,711
53	Corn grits	24,68	0,224	—	2,88	0,80	3,600	1,137

The data analysis presented in article [18] for the change of essential amino acid (EAA) structure animal protein, obtained from pig skin and/or bovine collagen containing raw material, also shows considerable fluctuations of the essential amino acid (EAA) content, for example, by tryptophan, valine, leucine and etc., what allow to determine the biological value (BV) and other indicators of a balanced amino acid structure of analyzed animal protein.

BV (biological values) of sodium Caseinate, wheat grain and rice are almost on the same level, while rice flour fine grinding has a high ability to heliopath opinion, especially in the production of cooked sausages and semiprod-ucts, and flour, processed the IR-radiation and obtained by thermoplastic extrusion method, has a high waterbind- ing, fatbinding, emulsifying and gel-forming abilities, and not inferior in these indicators the soy protein isolates, that correspondingly specified in the published works of domestic researchers [19, 21].

Surprising the fact of higher BV (biological value) de-fatted soy flour and soy con-centrate in com-pare with similar indicators of protein food fortifier, soybean [22], soy protein isolate [23] and soy isolated [24]. This differ-ence in BV (biological value) studied soy proteins can be explained by the modification of soy defatted and halfde-fatted flour proteolytic enzymes, acting on deep peptide bonds and cleaving pro-tein molecules into smaller frag-ments, herewith produces hydrolysates with a specific pro-file of peptides and amino acids sets. The results showed, that enzymatic modification of soy flour allows to obtain con-centrates and isolates contents from 30 to 90 % pro-tein, while there is a deep hydrolysis of proteins of the flour, converting them from insoluble to soluble state by receiving medium — and low-molecular proteins, and ac-cumulation of intermediate products of hydrolysis and low molecular weight nitrogen-containing compounds.

Researchers have shown that the amino acid content in% of the total amount of free amino acids in hydrolyzed soy flour, obtained by the action of different enzyme prepa-rations, contain the same set of amino acids, but their dis-tribution in samples is differ. That is why, apparently, with the change in the con-tent of essential amino acid (EAA) in soy concentrates a figure comparable redundancy of amino acids increases in 1.24 times, in soy isolates in 1.59 and in 2.05 times, and in soy enrichment in 2.31 times, which re-duces the BV (biological value) of concentrated and iso-lated soy proteins. On functional-technological properties and price these proteins are inferior to meat raw materials, including mechanically deboning poultry meat (MDPM), and vegetable protein from domestic cereals — buckwheat, oats and rice, so the authors approvals [16,17] that some types of protein raw materials, for example, mechanically deboning poultry meat (MDPM), are significantly less bio-logical value (BV) than the soy proteins and animal pro-teins from pig skin balanced amino acid composition that is not consistent with the results of researches of domestic and foreign authors.

VNIIPP experts proposed a system of classification of poultry meat by grades, making which involves the evalu-ation of individual bone and boneless types of lump and shredded meat according to objective quality indexes, such as ratio of fat mass fraction to mass fraction of protein, the protein quality index (ratio of tryptophan to hydroxypro-line), the ratio of the energy value and other indicators established for land and waterfowl and comparable with similar figures for beef and pork. The introduction of quantitative criteria for rating the quality of poultry meat for content of muscle, connective and fatty tissues (skin with fat) in eviscerated carcass and its parts, mounted their output and factors of consumer value (FCV), which are listed in directories according to the technology of cut-ting, deboning and trimming of main industrial processed poultry (Table. 1) enabled to use a fundamentally new ap-proach to determine the varieties of meat and edible offal.

Finished products, produced from meat land/water-fowl, are separated into the following classes depending on the number of used raw materials (lump of meat, me-chanically deboning poultry meat (MDPM) and food sub-products).

- **extra/select** — the grade of the finished product, dur-ing the production of which in the recipe provides bulk ground meat of land/waterfowl with mass fraction not less than 80 %, including meat breast portion — not less than 50 %;
- **high/low-fat** — grade of the finished product, during the production of which in the recipe pro-vides bulk ground meat of land/waterfowl with mass fraction not less than 80 %, including skin with fat for waterfowl — not more than 30 %;
- **first/bold** — the grade of the finished product, during the production of which in the recipe pro-vides bulk ground meat of land/waterfowl with mass fraction not less than 51 %, including skin with fat for waterfowl — not more than 50 %;
- **second** — grade of the finished product, during the production of which in the recipe provided by ground meat of mechanically deboned poultry and/or edible offal of poultry with mass fraction not less than 70 %, including skin with fat in raw meat is not more than 20 %;
- **one-grade** — grade of the finished product, during the production of which in the recipe provided meat land/waterfowl mechanically separated and/or edible offal of poultry mass fraction of meat and/or offal not less than 70 %, including skin and fat in raw meat is not more than 60 %. Refers to one-grade meat, obtained after al-location of the lump of meat from breast and legs of eviscerated poultry carcasses, with the set food bones has a residual excess flesh different tissues, which are separated from them during the mechanical debon-ing of obtaining, mechanically deboning poultry meat (MDPM), which is character-ized according to the cur-rent standard;

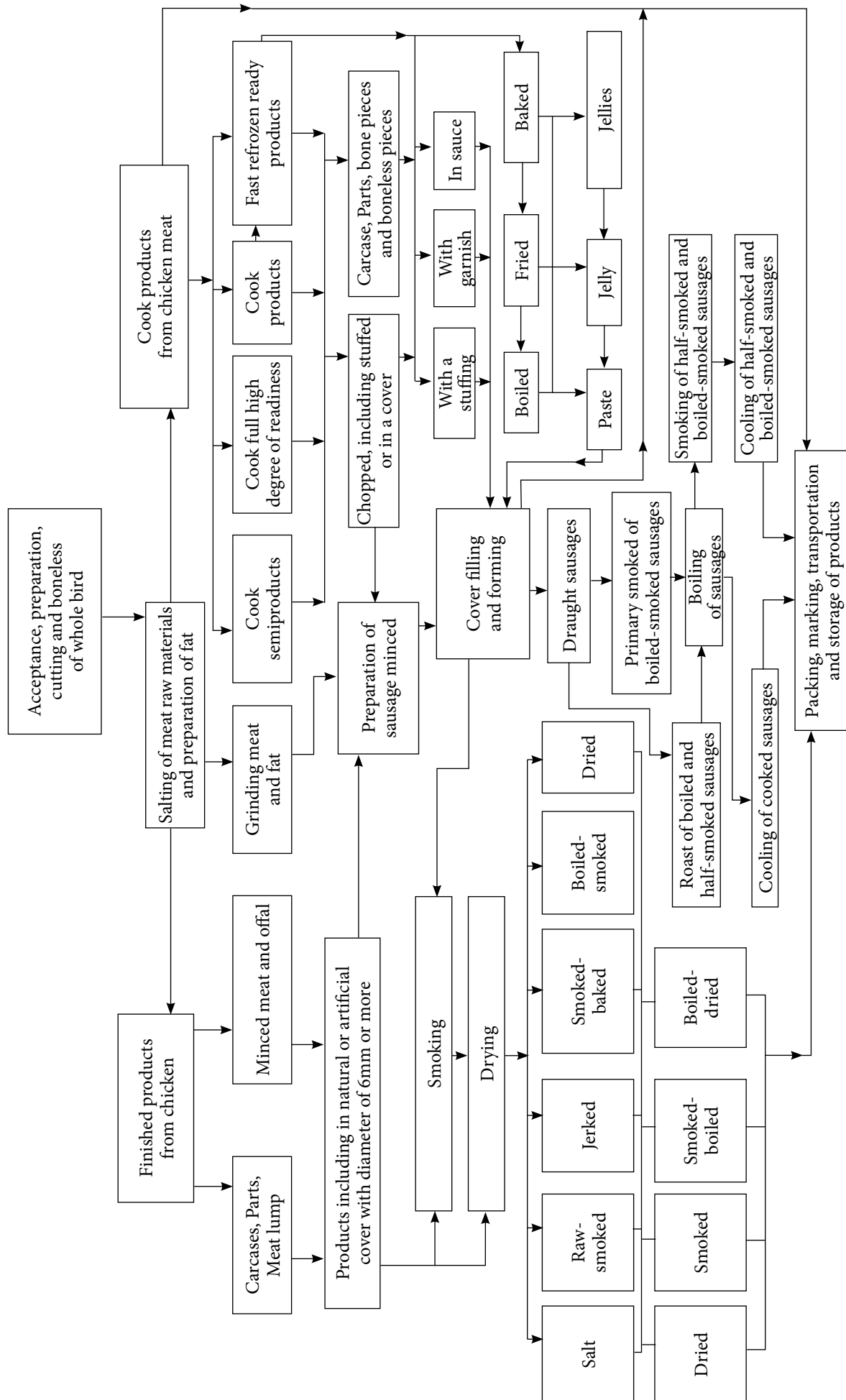


Fig. 2. Structure of production of poultry meat products

- **third/fat** — grade of the finished product, during the production of which in the recipe provided the meat of mechanically deboned poultry and/or edible offal of land/waterfowl with mass fraction not less than 51 %, including skin with fat for waterfowl — more than 60 %;
- **brand** — grade of the finished product, during the production of which in the recipe provided lump of ground meat of land/waterfowl with mass fraction from 40 % to 51 %, developed according to the original recipe and technology according to national, regional and other features.

If you are using meat and/or edible offal of poultry and slaughter animals, the grade of the finished product is determined by the mass fraction of the specific type of trimmed meat according to recipe, for example, with the mass fraction of the fillet 50 % and 30 % trimmed beef and/or pork the product belongs to the variety «extra» or «select»; with 50 % lean meat and 30 % trimmed beef and/or pork product refers to the sort of «high» or «low-fat»; if in the recipe of bulk poultry meat and trimmed meat of slaughter animals with mass fraction 51 % the product belongs to the class «first» or «bold» etc.».

The grade of the product during the same time using of land and waterfowl meat is determined by their total share in the formulation of specific product names.

The research results are formed the basis for the development of standards of the General technical conditions, and to the specific names of a wide range of prepared poultry products (Fig. 2)

Conclusion

The introduction of new production technologies meatpoultryproducts on the basis of new knowledge, current development techniques and technologies, taking into account national specificities and ensure their compliance with international requirements will provide incentives for the production of high quality products of different grades in a wide range, their acceptability and sustainability in the do-mestic market.

There were provided the systematization of raw meat of slaughter animals and poultry, some supplements of animal and vegetable origin according to their biological value.

Were developed the standards of the general technical conditions, and to specific names of wide variety of finished poultry products, the basic requirements to which listed in ten interstate and national standards, such as the method of determination of mass fraction of residual excess flesh of muscle tissue.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. United Nations Economic Commission for Europe. UNECE Standart «Chicken meat. Carcasses and parts». 2012 Edition/ United Nations// New York and Geneva. — 2013.
2. United Nations Economic Commission for Europe. UNECE Standart «Turkey meat. Carcasses and parts». 2012 Edition/ United Nations// New York and Geneva. — 2013.
3. United Nations Economic Commission for Europe. UNECE Standart «Duck meat. Carcasses and parts». /United Nations// New York, Geneva. — 2010.
4. Махонина, В.Н. (2009). Изучение объективных индексов качества мяса птицы для определения его сортности. *Птица и птицепродукты*, 3, 52–57.
5. Махонина, В.Н. (2016). Изучение морфологического и химического состава мяса потрошенных тушек уток для определения его сортности. *Птица и птицепродукты*, 1, 61–64.
6. Гоноцкий, В.А., Дубровская, В.И., Дубровский В.И. (1986). Повышение биологической ценности рубленых полуфабрикатов путем улучшения сбалансированности незаменимых аминокислот. *Птица и птицепродукты*, 4, 62–64.
7. Липатов, Н.Н. (1986). Некоторые аспекты моделирования аминокислотной сбалансированности пищевых продуктов. *Пищевая и перерабатывающая промышленность*, 4, 48–52.
8. Липатов, Н. Н., Рогов, И.А. (1987). Методология проектирования продуктов питания с требуемым комплексом показателей пищевой ценности. *Известия ВУЗов. Пищевая технология*, 2, 9–15.
9. Бражников, А.М. (1987). Теория термической обработки мясопродуктов. М, Агропромиздат. — 271 с.
10. Антипова, Л.В., Глотова, И.А., Рогов, И.А. (2001). Методы исследования мяса и мясных продуктов. М, Колос. — 376 с.
11. Лисин, П.А., Молибога, Е.А., Канушкина Ю.А., Смирнова Н.А. (2012). Оценка аминокислотного состава рецептурной смеси пищевых продуктов. *Аграрный вестник Урала*, 3 (95), 26–28.
12. Никитина, М.А., Завгороднева Д.В., Сусь Е.Б. (2014). Информационные технологии в разработке многокомпонентных мясных продуктов с учетом биологической ценности. *Все о мясе*, 4, 48–51.
13. Кутушев, Р. (2003). Уникальное утководческое предприятие. *Птицеводство*, 8, 9–10.
14. Долматова, И., Гадиев, Р., Ганиева, И., Кононенко, Р., Хафизов Р. (2005). Динамика количественных признаков продуктивности уток. *Птицеводство*, 11, 22–24.
15. Салаватулина, Р.М. (2005). Рациональное использование сырья в колбасном производстве. Санкт-Петербург, Гиорд. — 248 с.
16. Устюжанин, А.П. (2014). Не надо бояться соевых белков. *Мясные технологии*, 3, 12–15.
17. Багрянцева, О.В., Шевелева, С.А., Хотимченко, С.А., Батурин, А.К., Шатров, Г.Н., Мазо, В.К. (2013). Актуальные вопросы регламентирования качества и безопасности мяса и мясопродуктов. Взгляд гигиенистов. *Мясной ряд*, 3 (53), 12–15.
18. Смодлев, Н.А. (2000). Функционально-технологические свойства белков животного происхождения. *Мясная индустрия*, 1, 18–20.
19. Горбатов, В.М. Абдулаев М.А. (1980). Применение белковой пшеничной муки в колбасном производстве. *Мясная индустрия*, 2, 16–18.
20. Абрамова, Л.С. (2003). Поликомпонентные консервы для питания детей раннего возраста на основе рыбного сырья. М., ВНИРО. — 176 с.
21. Кудряшов, Л.С., Лебедева, Л.И., Войтова, И.Г. (2002). Перспективы использования рисовой муки при производстве мясных продуктов. *Мясная индустрия*, 8, 17–18.
22. Самылина, В.А. (2008). Пищевой соевый обогатитель для мясных изделий. *Мясная индустрия*, 10, 60–62.
23. Аминокислотный состав и количество суммарного белка в продуктах из бобов сои. [Электронный ресурс: <http://food-chem.ru/lektsii-po-khimii-belkov/86-aminokislotnij-sostav-i-kolichestvo-summarnogo.html>]. Дата обращения 15.04.2017]
24. Бадичко, Е.А. (2009). Исследование условий получения продуктов ферментативной модификации соевой муки и их биохимическая характеристика. Автореф. дис. канд. техн. наук. Москва, МГУПП. — 24 с.

REFERENCES

1. United Nations Economic Commission for Europe. UNECE Standart «Chicken meat. Carcasses and parts». 2012 Edition/ United Nations// New York and Geneva. — 2013.
2. United Nations Economic Commission for Europe. UNECE Standart «Turkey meat. Carcasses and parts». 2012 Edition/ United Nations// New York and Geneva. — 2013.
3. United Nations Economic Commission for Europe. UNECE Standart «Duck meat. Carcasses and parts». /United Nations// New York, Geneva. — 2010.
4. Makhonina, V.N. (2009). The study of objective quality indexes of the chicken meat to determine its grade. *Poultry and poultry products*, 3, 52–57. (in Russian).
5. Makhonina, V.N. (2016). The study of morphological and chemical structure of the meat of whole ducks to determine its grade. *Poultry and poultry products*, 1, 61–64. (in Russian).
6. Gonotsky, V.A., Dubrovskaya, V.I., Dubrovsky, V.I. (1986). Increasing of the biological value of chopped semiproductions by improving the balance of essential aminoacids. *Poultry and poultry products*, 4, 62–64. (in Russian).
7. Lipatov, N.N. (1986). Some aspects of modeling the amino-acid balance of food. *Food and processing industry*, 4, 48–52. (in Russian).
8. Lipatov, N.N., Rogov I.A. (1987). Methodology design of food with required set of food value indicators. *Izvestia vuzov. Pishhevaya tekhnologiya*, 2, 9–15. (in Russian).
9. Brazhnikov, A.M. (1987). Theory of heat treatment of meat products. Moscow, Agropromizdat. — 271 c. (in Russian).
10. Antipova, K.V., Glotova, I.A., Rogov, I.A. (2001). Research methods of meat and meat products Moscow, Kolos. — 376 c. (in Russian).
11. Lisin, P.A., Moliboga, E.A., Kanushina, J.A., Smirnova, N.A. (2012). Estimation amino-acid of structure retsepturnoj of the mix foodstuv. *Agrarian herald of the Urals*, 3 (95), 26–28.
12. Nikitina, M.A., Sus, E.B., Zavgorodneva, D.V. (2014). Information technologies in development of multicomponent meat products taking into account biological value. *Vsyo o myase*, 4, 48–51. (in Russian).
13. Kutushev, R. (2003). Unique duckfarming factory Poultry farming, 8, 9–10. *Poultry farming*, 8, 9–10.
14. Dolmatova, I., Gadiev, R., Ganieva, I., Kononenko, R., Khafizov, R. (2005). Dynamic of the quantitative productivity characteristics of ducks. *Poultry farming*, 11, 22–24. (in Russian).
15. Salavatulina, R.M. (2005). Rational use of raw materials in sausage production. St. Petersburg, GIOR, 248 p. (in Russian).
16. Ustuzhanin, A.P. (2014). No need to fear soy proteins. *Meat Technology*, 3, 12–15. (in Russian).
17. Bagryantseva, O.V., Sheveleva, S.A., Khotimchenko, S.A., Baturin, A.K., Shatrov, G.N., Mazo, V.K. (2013). Actual questions of quality regulation and safety of meat and meat products. Opinion of hygienists. *Meat ryad*, 3 (53), 12–15. (in Russian).
18. Smodlev, N.A. (2000). Functional and technological properties of animal proteins. *Meat industry*, 1, 18–20. (in Russian).
19. Gorbatov, V.M., Abdulaev, M.A. (1980). The use of protein wheat flour in the production of sausages. *Meat industry*, 2, 16–18. (in Russian).
20. Abramova, L.S. (2003). Multicomponent canned products for nutrition of early age children based on fish raw materials. Moscow, VNIRO. — 176 c. (in Russian).
21. Kudryashov, L.S., Lebedeva, L.I., Voitova, I.G. (2002). Perspectives of using of rice flour in the production of meat products. *Meat industry*, 8, 17–18. (in Russian).
22. Samylin, V.A. (2008). Edible soy enrichment for meat products *Meat industry*, 10, 60–62. (in Russian).
23. Aminoacid structure and the amount of total protein in products from soy beans. [Electronic resource: <http://food-chem.ru/lektsii-po-khimii-belkov/86-aminokislotnij-sostav-i-kolichestvo-summarnogo.html>. Access date 15.04.2017]
24. Badichko, E.A. (2009). The study of conditions for obtaining the products of enzymatic modification of soy flour and their biochemical characteristic. Author's abstract of the dissertation for the scientific degree of Candidat of Technical Science. Moscow, MGUPP. — 24 c. (in Russian).

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Принадлежность к организации

Махонина Валентина Николаевна — кандидат технических наук, ведущий научный сотрудник, «Всероссийский научно-исследовательский институт птицеперерабатывающей промышленности» — филиал Федерального научного центра «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» Российской академии наук.
141552, Московская обл., Солнечногорский р-н, Ржавки рп., строение 1.
Тел. +7-495-944-52-20.
E-mail: mahonina506@mail.ru
*автор для контактов

Агафонов Валерий Петрович — доктор технических наук, главный научный сотрудник, «Всероссийский научно-исследовательский институт птицеперерабатывающей промышленности» — филиал Федерального научного центра «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» Российской академии наук.
141552, Московская обл., Солнечногорский р-н, Ржавки рп., строение 1.
Тел. +7-495-944-63-13.
E-mail: av@dinfo.ru

Критерии авторства

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 29.05.2017

AUTHOR INFORMATION

Affiliation

Valentina N. Makhonina — candidat of technical sciences, leading research scientist «All-Russian Scientific Research Institute of Poultry Processing Industry» — Branch of the Federal State Budget Scientific Institution Federal Scientific Center «All-Russian Research and Technological Poultry Institute» of Russian Academy of Sciences.
141552, Rzhavki, Moscow region.
Tel: +7-495-944-52-20.
E-mail: mahonina506@mail.ru
*corresponding author

Valerij P. Agafonichev — doctor of technical sciences, chief research scientist «All-Russian Scientific Research Institute of Poultry Processing Industry» — Branch of the Federal State Budget Scientific Institution Federal Scientific Center «All-Russian Research and Technological Poultry Institute» of Russian Academy of Sciences.
141552, Rzhavki, Moscow region.
Tel: +7-495-944-63-13.
E-mail: av@dinfo.ru

Contribution

The authors equally contributed to the writing of the manuscript and are equally responsible for plagiarism.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Received 29.05.2017