

На правах рукописи



БОРИСОВА ИРИНА ЮРЬЕВНА

**УСКОРЕННЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ
КОНТАМИНАЦИИ МЯСА И ПОВЕРХНОСТЕЙ
ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ОБОРУДОВАНИЯ.**

16.00.06 – ветеринарная санитария, экология, зоогигиена
и ветеринарно-санитарная экспертиза.

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2006г.

Работа выполнена в Государственном научном учреждении Всероссийском научно-исследовательском институте ветеринарной санитарии, гигиены и экологии Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИИВСГЭ Россельхозакадемии) в отделе технического регулирования, стандартизации и сертификации.

Научный руководитель:

кандидат ветеринарных наук
Шурдуба Николай Александрович
(ГНУ ВНИИВСГЭ).

Официальные оппоненты:

Доктор ветеринарных наук, профессор

Долгов Виктор Андреевич
(ГНУ ВНИИВСГЭ);

Доктор биологических наук, профессор

Фомичев Юрий Павлович
ГНУ всероссийский научно-исследовательский институт животноводства (ГНУ ВНИИЖ)

Ведущая организация: Московский Государственный Университет
Прикладной Биотехнологии (МГУПБ)

Защита состоится «30» ноября 2006 г. в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 006.008.01 при ГНУ Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной санитарии, гигиены и экологии (123022, Москва, Звенигородское шоссе, д. 5).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Государственного Научного Учреждения Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной санитарии, гигиены и экологии Россельхозакадемии.

Автореферат разослан «24» октября 2006г.

Ученый секретарь

диссертационного совета, канд. биол. наук



Е.С. Майстренко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Задача повышения качества продукции животного происхождения – одна из наиболее важных на современном этапе развития сельского хозяйства. В соответствии с вступлением в действие закона РФ о техническом регулировании, возрастает роль ветеринарно-санитарных мер, предусматривающих требования к мясу, его производству, процедурам испытания, инспектирования, подтверждения соответствия для обеспечения безопасности мясной продукции для потребителя.

Одним из важных показателей качества мяса и мясных продуктов является их свежесть. Под понятием «свежее мясо» понимается продукт, полученный от здоровых животных, транспортирование и убой которых проводились в строгом соответствии с действующими ветеринарными требованиями, а охлаждение, заморозка, хранение и реализация – в соответствии с санитарными и технологическими нормативами. Определить степень свежести на начальных стадиях порчи очень сложно и вместе с тем очень важно с гигиенической и экономической точек зрения. Сложность вопроса заключается в том, что основной органолептический метод исследования мяса на свежесть субъективен (Пяткин К.Д.1980; Huhtanen C.N. et al., 1975; Otero A., et al., 1985, Mayr D. et al., 2003). Поэтому при оценке незначительных изменений в мясе на начальной стадии порчи он не может быть решающим.

Как известно, фактором, влияющим на свежесть мяса и мясопродуктов, являются микробные контаминанты, которые являются возбудителями порчи этих продуктов. Микроорганизмы постоянно контаминируют поверхности технологического оборудования, мясных туш и готовых мясных продуктов. При нарушении температурно-влажностных режимов и сроков хранения мяса и мясных продуктов микроорганизмы через активность собственных протеолитических ферментов также вызывают распад не только мышечной ткани, но и дальнейшие ферментативные превращения тех полураспавшихся продуктов, которые характерны для свежего мяса. При этом заметно

изменяются органолептические характеристики мяса, которое становится испорченным и опасным для здоровья потребителя (Калина Г.П., 1969; Мюнх Г.-Д., Заупе Х., Шрайтер М, 1985).

В большей степени снижение микробной контаминации мяса в процессе первичной переработки скота обеспечивает соблюдение ветеринарно-санитарных и гигиенических условий с использованием эффективных средств и методов санитарной обработки и профилактической дезинфекции, в совокупности с ускоренными методами контроля микробного загрязнения мяса и технологического оборудования, соприкасающегося с ним.

Существующие средства и методы определения уровня бактериальной контаминации продукции и поверхностей технологического оборудования в процессе первичной переработки скота трудоёмки, малопроизводительны и не могут быть использованы для оперативного контроля качества мяса, особенно на малых предприятиях, где отсутствуют бактериологические лаборатории. Отсюда возникла необходимость изыскания объективных ускоренных, надёжных по своей специфичности и чувствительности лабораторных методов исследования мяса на свежесть и методов контроля качества проводимых на предприятии ветеринарно-санитарных мероприятий.

Цель и задачи исследований. Целью работы являлась разработка метода контроля ветеринарно-санитарного состояния мясоперерабатывающих предприятий и ускоренного метода оценки качества мяса на основе каталазной активности бактериальных контаминантов. Для достижения данной цели мы поставили перед собой следующие задачи:

1. Изучить возможность использования суммарного уровня аденозин5'-трифосфата (АТФ) в смывах для контроля санитарно-гигиенического состояния технологического оборудования.
2. Испытать биOLUMИнесцентный метод контроля для определения уровня АТФ в условиях мясоперерабатывающего производства, изучить его чувствительность и специфичность.

3. Определить критерии содержания суммарного АТФ в смывах для классификации степени чистоты поверхностей.
4. Разработать ускоренный метод определения свежести мяса и мясопродуктов на основе определения активности каталазы бактериальных контаминантов.
5. Изучить зависимость между уровнем активности каталазы и степенью свежести мяса убойных животных.
6. Разработать методические рекомендации и указания по определению свежести мяса и санитарно-гигиенического состояния оборудования мясоперерабатывающих предприятий.

Научная новизна. На основании проведённых исследований по изучению возможности использования метода Rida®АТФ с разработанными нами методическими приёмами для определения санитарно-гигиенического состояния мясоперерабатывающих предприятий определены критерии чистоты оборудования по уровню АТФ, позволяющие рекомендовать данный метод для практического применения.

Изучена динамика изменения уровня активности каталазы в мясе убойных животных в зависимости от зрелости и степени свежести мяса. В процессе созревания мяса происходит резкое падение первоначально высокого уровня тканевой каталазы. Затем в созревшем мясе уровень тканевой каталазы практически не изменяется. Показано, что в процессе порчи мяса происходит увеличение активности фермента за счёт роста количества бактерий при незначительном уровне мышечной каталазы в качестве фона.

В результате проведённых исследований нами впервые разработан метод определения качества мяса на основе активности каталазы бактериальных контаминантов. Данный метод определения свежести мяса имеет существенные преимущества по сравнению с классическими методами по своей специфичности, простоте и скорости получения результатов и может быть использован для прогнозирования срока хранения мясного сырья.

Практическая ценность работы.

На основании результатов исследований разработаны:

- «Методические указания по ускоренному определению санитарно-гигиенического состояния мясоперерабатывающих предприятий с помощью метода Rida®АТФ» (утверждены Департаментом ветеринарии МСХ РФ 26.03.04 г. за №13-5-02/0974);
- «Методические рекомендации по определению свежести мяса на основе анализа активности каталазы бактериальных контаминантов» (утверждены Отделением ветеринарной медицины Россельхозакадемии 27.04.2005 г).

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на:

- 4-ой Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины и ветеринарно-санитарного контроля сельскохозяйственной продукции» (Москва, 2002 г);
- 5-ой Международной научно-практической конференции «Пища. Экология. Человек» (Москва, 2003);
- XII-ом Всероссийском ветеринарном конгрессе (Москва, 2004);
- 5-ой Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины и ветеринарно-санитарного контроля сельскохозяйственной продукции» (Москва, 2004 г);
- заседаниях Учёного совета ВНИИВСГЭ;
- межлабораторном совещании ВНИИВСГЭ (2005 г).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 научных статей.

Объём и структура диссертации. Диссертация изложена на 148 стр. машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, практических предложений, списка литературы и приложений. Список литературы включает 154 источника (81 отечественных и 73 зарубежных авторов). Работа иллюстрирована 12 таблицами, 3 графиками и 3 рисунками.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы исследований.

Диссертационная работа проводилась в период с 2001 по 2005 гг. в отдел технического регулирования, стандартизации и сертификации ВНИИВСГЭ на основании плана научно-исследовательских работ ВНИИВСГЭ и является частью темы 05.02.01.29.2. Образцы отбирали на следующих мясокомбинатах: МПЦ «Полтево» (Московская обл.), ООО «Алгер» (г. Егорьевск Московской обл.), ООО «Вегус», ОАО «ИКМА» (г. Москва), на убойном пункте совхоз «Озерецкий» Орехово-Зуевского района Московской области, а также в мясных отделах рынков и магазинов г. Москвы.

Объектом исследований служили: мясо охлажденное и замороженное (свинина, говядина), различные мясoproductы, как крупнокусковые, так и мелкокусковые, а также смывы с поверхностей технологического оборудования (куттер, мясорубка, бункер сосисочного автомата и т.д.) и ограждающих конструкций (пол, стены) мясоперерабатывающих предприятий. Всего было исследовано 638 образцов мяса убойного скота и 56 производственных проб смывов с поверхностей оборудования и ограждающих конструкций.

Контроль санитарного состояния производства, в том числе микробиологический контроль качества санитарной обработки, осуществляли в соответствии с отраслевым нормативным документом (ОНД) «Порядок санитарно-микробиологического контроля производства мяса и мясных продуктов», утвержденным Минсельхозпродом России 15.12.1995 г., и «Инструкцией по порядку и периодичности контроля за содержанием микробиологических и химических загрязнений в мясе, птице, яйцах и продуктах их переработки», утвержденной Минсельхозпродом России 27.06.2000 г. В работе использовали Люминометр Бертольд ВЕГА и набор для определения состояния поверхностей RIDA®АТФ (Германия).

Активность каталазы определяли перманганатометрическим методом Баха А.Н и Зубковой С.А. (1937 г).

Отбор образцов мяса и определение свежести проводили по ГОСТу 7269-79 «Мясо. Методы отбора образцов и органолептические методы определения свежести» и ГОСТ 23392-78 «Мясо. Методы химического и микроскопического анализа свежести». Определение количества мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) в мясе проводили по ГОСТу 10444.15.94 «Продукты пищевые. Методы определения КМАФАнМ».

Для моделирования разной степени свежести образец мяса (предварительно разделённый на несколько равных частей, весом не менее 200 г) хранили в холодильнике при температуре $(8,0 \pm 1,5^{\circ}\text{C})$ в течение 7 - 10 дней, чтобы получить различную микробную обсемененность, и исследовали одновременно несколькими методами каждые 1-2 дня.

Статистическую обработку полученных данных и построение необходимых графиков проводили с использованием компьютерной программы Excel.

Результаты исследований

1. Определение критериев содержания АТФ в смывах для определения санитарно-гигиенического состояния мясоперерабатывающих предприятий при использовании биолюминесцентного метода RIDA®АТФ.

В настоящее время, согласно программе ХАССП, необходимо применять инструментальные методы контроля чистоты производства. Наиболее перспективным является биолюминесцентный метод, основанный на измерении концентрации аденозин-5'-трифосфата (АТФ) в анализируемом образце при помощи люциферин-люциферазной системы светляков. Смыв с поверхности оборудования исследуется на суммарную АТФ, как на индикатор потенциальной среды для размножения бактерий, вызывающих порчу продукции.

После убоя животного в мышечной ткани резко уменьшается количество АТФ. Охлаждение и замораживание мяса удлиняет период распада АТФ. Таким образом, фрагменты мышечной ткани, кровь имеют определённое количество

АТФ. Наличие мясных фрагментов является питательным субстратом для развития микроорганизмов. АТФ – один из ключевых внутриклеточных метаболитов, присутствующий в относительно больших количествах во всех живых микробных клетках и быстро разрушающийся при их гибели. Таким образом, в процессе обработки туш и производства мясопродуктов происходит постоянное загрязнение поверхностей цехов и оборудования пищевыми фрагментами и микроорганизмами, образующими суммарную АТФ, которую мы определяли, используя метод RIDA®АТФ. Любое количество АТФ выше фонового уровня, независимо от источника происхождения (микроорганизмы, органические частицы, кровь), будет указывать на загрязнение поверхностей оборудования, на котором изготавливаются мясные продукты.

Для измерения внутриклеточного бактериального или небактериального АТФ необходимо предварительное повреждение клеточной стенки и мембраны сильными химическими агентами так, чтобы произошло разрушение не только ферментативной системы, синтезирующей АТФ, но и системы, гидролизующей АТФ. В этом случае в экстракте концентрация АТФ остается постоянной и равной той концентрации АТФ, которая была в клетке в момент ее гибели. Для этого мы использовали экстрагирующий раствор, который распыляли на исследуемую поверхность с помощью пульверизатора.

Затем поверхность протирали сухим ватным стерильным тампоном. Эта технология характеризуется высокой эффективностью сбора АТФ с исследуемой поверхности. К достоинствам этого способа следует отнести и то, что, поскольку не используются пробирки с жидкими реагентами, отсутствует угроза разлива реагентов в случае поломки кюветы. Сухой метод сбора АТФ с увлажнённой экстрагирующим раствором поверхности также значительно снижает стоимость исследований.

Биолюминесцентная реакция начинается при контакте тампона со смывом с внутренней поверхностью кюветы-пробирки, на которую нанесён тонкоплёночный реагент (люциферин-люцифераза). Тонкий стержень тампона

облегчает его вращение в кювете-пробирке, тем самым гарантируя высокую эффективность перемешивания реагентов.

На последней стадии исследования детекторную пробирку помещали в люминометр, в котором измеряли интенсивность люминесценции в RLU/s (количество Относительных Световых Единиц за 1 сек), возникающей в результате взаимодействия пленочных реагентов в детекторной пробирке с АТФ, собранной с исследуемой поверхности. Специальная конструкция оптического датчика люминометра обеспечивает сбор и регистрацию люминесценции, испускаемой пробиркой во все стороны, таким образом исключая занижение результата вследствие неравномерного распределения АТФ на тампоне. Результат исследований может нормироваться по фону как «чисто», «условно чисто» или «грязно».

На первом этапе мы провели исследование различных объектов, поверхность которых загрязняли искусственно в лабораторных условиях, нанося смешанную культуру микроорганизмов и фрагменты мышечной ткани.

Использовали следующие тест-объекты: плитка глазурованная, плитка метлахская, внутренняя поверхность кастрюли из нержавеющей стали, разделочная доска из полиуретана тефлоновая, внутренняя поверхность чашки Петри. Параллельно определяли уровень суммарной АТФ и КМАФАнМ. Из полученных данных видно, что при увеличении КМАФАнМ происходит увеличение уровня АТФ. В процессе проведения санитарных мероприятий наблюдается снижение обоих показателей. Следует отметить, что при использовании только мойки с использованием щетки на поверхности тест-объектов мы не наблюдали следов видимых загрязнений. В то же время при проведении тестов на качество ветеринарно-санитарных мероприятий (КМАФАнМ и уровень АТФ) обнаруживали наличие микрофлоры на исследуемых поверхностях. По действующим правилам качество мойки оценивалось, как «чисто». Но, как уже указывалось выше, наличие даже остаточной микрофлоры может привести к последующей порче мясной продукции. Эти предварительные опыты показали, что метод Rida®АТФ

эффективно определяет степень чистоты поверхностей. Также данным методом можно быстро определить качество дезинфекции, оценить действие того или иного дезинфицирующего средства при его выборе для использования на предприятии.

На следующем этапе нашей работы для определения числовых критериев уровня АТФ, соответствующих показателям чистоты поверхностей, мы провели производственные испытания эффективности биOLUMИнесцентного метода Rida®АТФ в сравнении с прямым, классическим методом подсчёта КМАФАнМ по КОЕ/см² на мясокомбинатах Москвы и Московской области. Полученные данные представлены на графике 1 (данные по КМАФАнМ от 0 до 10⁴ КОЕ/г). Анализ полученных результатов позволил установить, что, чем выше уровень КМАФАнМ, тем выше уровень АТФ в смыве. Согласно графику 1, коэффициент корреляции между биOLUMИнесцентным и стандартным чашечным методами был равен 0,78. Разброс точек можно объяснить тем фактом, что мы сравниваем суммарную АТФ, т.е. помимо бактериальной, ещё и соматическую, при нормировании на уровень бактерий (КМАФАнМ). Исходя из полученных данных, были определены интервалы содержания суммарного АТФ в смывах и предложена ориентировочная градуированная таблица для классификации степени чистоты поверхностей, качества мойки и дезинфекции (Таблица 1).

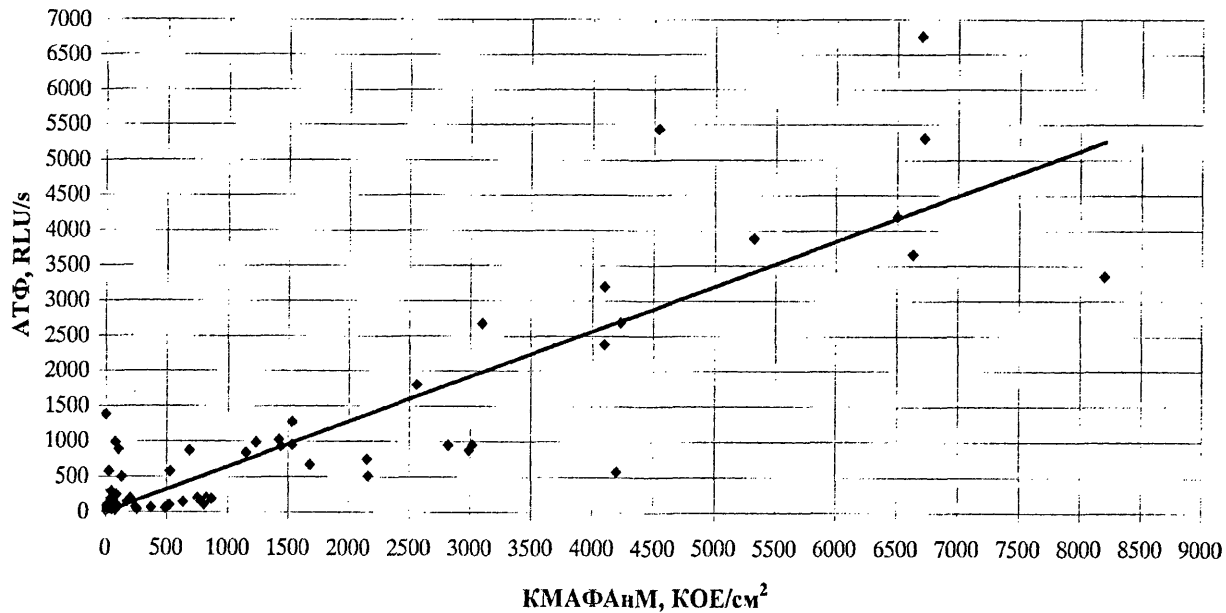
Таблица 1

Предлагаемая градуировочная таблица для определения степени чистоты поверхностей, определяемой методом Rida®АТФ.

Количество RLU/s	Степень чистоты оборудования	Количество МАФАнМ, КОЕ/мл
0-1000	«Чисто»	$<1,0 \times 10^3$
1000-2500	«Условно чисто»	$1,0 \times 10^3 - 3,0 \times 10^3$
>2500	«Грязно»	$>3,0 \times 10^3$

График 1

Зависимость между количеством КОЕ и содержанием суммарной АТФ в образцах смывов с объектов
мясокомбинатов.



Следует отметить, что для каждого звена технологического процесса на мясоперерабатывающем предприятии необходимо провести санитарно-микробиологическую калибровку значения АТФ, соответствующего степени чистоты поверхности для конкретного объекта (пол, стены, оборудование, разделочные доски и т.п.) в сравнении с классическим микробиологическим методом.

Процедура исследования качества проведённых ветеринарно-санитарных мероприятий при использовании метода Rida®АТФ занимает 2 минуты, и если результаты указывают на недостаточную очистку, то мойка и дезинфекция могут быть повторены прежде, чем будет нанесен вред качеству производимой на предприятии продукции. При этом не надо ждать 72 ч при использовании классических методов микробиологического контроля согласно действующим инструкциям. Также сокращается время подготовки к анализу, так как нет необходимости в подготовке посуды, сред и нет необходимости в нумерации пробирок в зависимости от места отбора образцов, поскольку эти данные вводятся сразу в память люминометра. При этом сохраняется вся серия проведённых измерений за длительный период времени, например, за год. Можно оценить влияние времени года и других факторов на состояние производства.

Предложенный нами биолюминесцентный метод RIDA®АТФ и определенные на его основе критерии содержания суммарного АТФ в смывах для классификации степени чистоты производственных поверхностей стали основой разработанных нами «Методических указаний по ускоренному определению санитарно-гигиенического состояния мясоперерабатывающих предприятий с помощью метода Rida®АТФ», утвержденных в Департаменте ветеринарии МСХ РФ за №13-5-02/0974 26.03.04 г.

2. Разработка метода определения свежести мяса на основе ферментативной активности бактериальных контаминантов.

2.1 Разработка перманганатометрического метода определения количества каталазы в мясе.

Изучению способов оценки свежести мяса посвящено очень большое количество работ. Особый интерес вызывают такие способы, которые давали бы возможность учесть порчу мяса количественными показателями, а также были бы тесно связаны с жизнедеятельностью бактерий. К таковым могут быть отнесены методы, дающие возможность учесть нарастающую активность ферментов в мясе в зависимости от размножения микроорганизмов.

Каталаза (КФ 1.11.1.6.) представляет собой гемсодержащий фермент с молекулярной массой около 250000 Д, локализованный в пероксисомах клеток. Наибольшее значение для определения свежести и доброкачественности мясного сырья имеет микробная каталаза, содержание которой определяется количеством бактериальных клеток. Каталазная активность обнаружена у всех облигатно- и факультативно-аэробных прокариот. Среди облигатных анаэробов этот фермент распространен в значительно меньшей степени, но все же, согласно последним данным [Брюханов А.И. с соавт., 2002], присутствует.

Следует отметить, что, поскольку после убоя животное обескровливают (т.е. каталаза крови уходит), а изначально в мышечной ткани уровень каталазы невелик, можно предположить небольшое фоновое содержание данного фермента в созревшем мясе. Итак, используемый в нашей работе мясной экстракт содержит суммарную каталазу: фоновую тканевую и микробиальную. Чем выше число бактерий, тем больше уровень каталазы. Это и легло в основу разработанной нами методики определения свежести мяса. На первом этапе своей работы мы предприняли попытку изучить активность каталазы объёмным методом. Принцип этого метода состоит в следующем. К мясному экстракту прибавляли заведомый избыток

перекиси водорода. Последняя под влиянием фермента каталазы начинает распадаться с выделением свободного кислорода. Спустя некоторое время реакцию прерывали внесением в смесь кислоты и остаток непрореагировавшей перекиси водорода определяли в кислой среде с помощью 0,1 н раствора марганцовокислого калия по схеме:



На графике 2 представлены результаты работы по определению времени, на которое мы оставляем мясной сок с перекисью. Для этого определяли уровень каталазы через 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25 и 30 мин. Изучали образцы мяса различной степени свежести. Все представленные результаты свидетельствуют, во-первых, о большой разнице между активностью каталазы свежего мяса и испорченного, и, во-вторых, показывают, что наибольшая разница в реакции между продуктами замечается в первые 5 минут. За этот именно период кривые дают наиболее крутой подъём. На основании изучения кривых ферментативного раствора во времени как для свежего, так и несвежего мяса, был сделан вывод, что для учета уровня активности каталазы в реакции достаточно 5 минут.

В следующем опыте исследовали образцы мяса, взятого непосредственно после убоя животных. При этом мы исследовали образцы мясного экстракта, не используя обжиг поверхности образца, так как хотели узнать общий уровень бактериальных контаминантов.

По уровням активности каталазы в зависимости от дня эксперимента был построен график 3. Из полученных данных видно, что при созревании мяса (с 1 по 3 день эксперимента) происходит резкое падение уровня каталазы. Так как микроорганизмы в тот момент развиваются медленно, мы сделали вывод, что идёт разрушение тканевой каталазы до фонового уровня. При увеличении общей микробной контаминации в охлаждённом (созревшем) мясе активность каталазы возрастает в несколько раз, что свидетельствует о ее бактериальном происхождении и степени свежести. Мы определили следующие цифровые критерии уровня активности каталазы в

График 2

Изменение активности каталазы в образце говядины (лопатка) в зависимости от времени выдерживания мясного сока с перекисью.

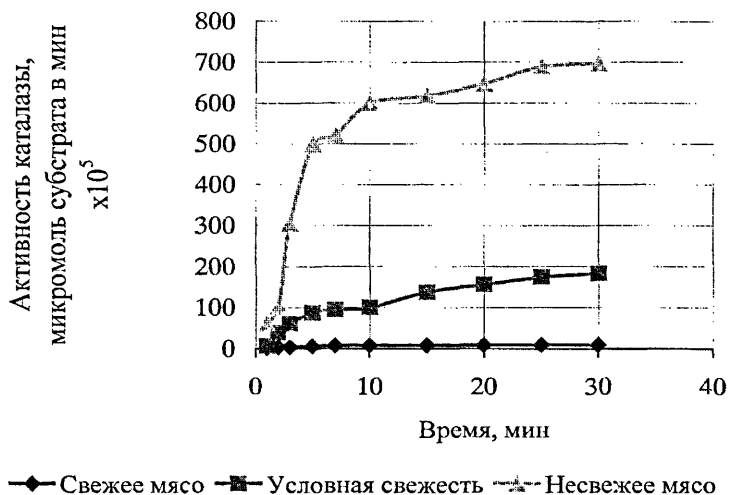
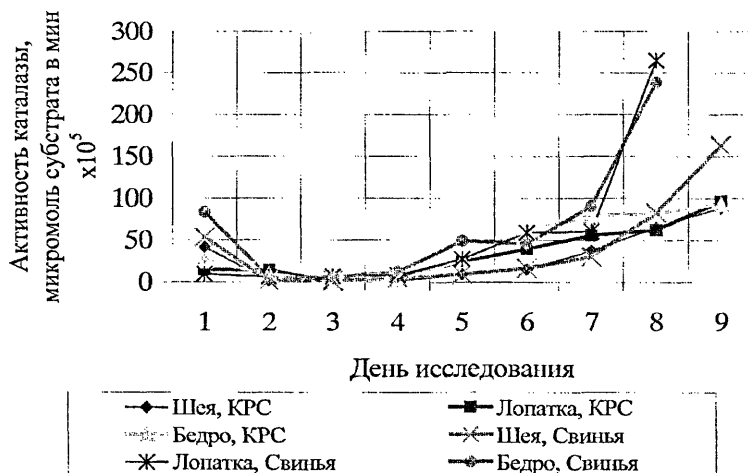


График 3

Изменение активности каталазы в процессе созревания мяса и его порчи.



мясе: для «свежего» - $(8,43 \pm 5,21) \times 10^5$ мкмоль субстрата/мин, для «условно свежего» - $(4,6 \pm 2,2) \times 10^6$ мкмоль субстрата/мин и для «несвежего» - от $(7,21 \pm 1,69) \times 10^6$ до $(2,91 \pm 1,16) \times 10^7$ мкмоль субстрата/мин.

Таким образом, из полученных данных можно сделать вывод о перспективности использования метода определения активности каталазы перманганатометрическим методом для определения свежести мяса. Уровень активности каталазы определяется в числовом эквиваленте. Но в силу ряда причин мы считаем, что данный метод неудобен для практического применения, так как трудоёмок и имеет низкую производительность.

2.2. Разработка метода определения активности каталазы в мясе и мясопродуктах по скорости распада определённого количества H_2O_2 .

В 1950 г. Ф.С.Околов предположил, что активность каталазы может быть изучена не только по количеству распавшейся перекиси водорода, но также и по скорости распада определённого её количества. Этот принцип мы решили проверить и положили его в основу разработанной нами методики определения каталазной активности в мясе.

Перекись водорода, как известно, подвергается воздействию двух ферментов: каталазы и пероксидазы. Из них каталаза разлагает H_2O_2 на O и H_2O , а пероксидаза с помощью кислорода перекиси дегидрирует вещества типа фенолов. Если в экстракт мяса, содержащий каталазу, внести небольшое количество перекиси водорода и затем оставить смесь стоять в течение различных периодов времени, то в том случае, когда каталазы в экстракте будет много, перекись разрушится и исчезнет быстро. Если каталазы мало, то наоборот, перекись удаётся найти в течение длительного срока.

Чтобы обнаружить присутствие остаточной перекиси водорода, надо добавить растворы пероксидазы и реактива для её выявления. Жидкость изменит цвет при присутствии перекиси. В случае, когда каталаза разрушит всю перекись водорода, внесение пероксидазы и красителя не даст феномена окисления, жидкость не изменит цвета.

При разработке метода мы подбирали оптимальные условия анализа: объём и концентрацию исходного экстракта из мяса; кислоту и её концентрацию для остановки реакции; количество пероксидазы; красители для выявления пероксидазы; время учёта реакции.

На первом этапе исследований мы использовали чистый мясной сок, получаемый с помощью бытового пресса. При работе с ним образовывался столбик стойкой пены, мешающий перемешиванию реактивов. Для её устранения мы стали использовать различные разведения экстракта мяса в физиологическом растворе. Использовали разведения в 2, 5 и 10 раз. Нами было установлено, что 1 мл десятикратного разведения экстракта мяса достаточно для оптимальной работы. При этом достигается равномерное перемешивание всех реактивов и проводится чёткий учёт результатов изменения цвета при визуальном наблюдении, образование пены незначительно, лишь на поверхности.

Для выявления активности пероксидазы существует большое количество различных реактивов. Полученные данные по испытанию некоторых из них представлены в таблице 2. Наилучшие результаты мы получили при добавлении *o*-фенилендиамина. Яркое, контрастное соломенно-оранжевое окрашивание проявлялось сразу и не исчезало со временем. Как запасной вариант приемлемо окрашивание 4-аминоантипирином. При этом образуется менее стойкий окрашенный в малиновый цвет комплекс, времени для учёта реакции вполне хватает.

В целом предлагаемая схема анализа состоит из нескольких этапов. Десятикратное разведение мясного экстракта, полученного с помощью бытового пресса, разливали в 7 пробирок по 1 мл. Потом добавляли по 0,5 мл 2-3% раствора перекиси водорода в каждую пробирку. Через определённые промежутки времени (1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 мин) прибавляли при взбалтывании 3-4 капли 1% уксусной кислоты, 1 мл пероксидазы и 3 капли раствора индикатора на пероксидазу (*o*-фенилендиамина; 4-аминоантипирин).

Затем следует отметить время, при котором происходит окрашивание раствора, и время, когда его не будет.

Таблица 2

Результаты испытаний различных видов индикаторов на пероксидазу

№	Краситель	Цвет	Время проявления окрашивания	Стойкость окрашивания.
1	бензидин	Синий	Появляется через 10-15 сек после встряхивания смеси	Исчезает через 1-2 минуты
2	о-фенилендиамин	Соломенно-оранжевый	Появляется сразу после встряхивания смеси	Стойкое
3	4-амино-антипирин	Малиновый	Появляется постепенно в течение 1 минуты	Постепенно бледнеет и исчезает (через 30 мин)
4	фенол	Коричневый, переходящий в чёрный	Появляется постепенно в течение 2 минут	Трудно отличимое, не стойкое
5	4-амино-антипирин + Фенол	Малиновый	Появляется постепенно в течение 1 минуты	Постепенно бледнеет и исчезает
6	азопирам	Вначале обычно фиолетово-синий, быстро переходящий в сиренево-пурпурный или буроватый	Появляется сразу после встряхивания смеси или в течение 1 минуты	Стойкое

На следующем этапе для изучения зависимости между уровнем активности каталазы и степенью свежести мяса были исследованы различные образцы мяса и мясopодуkтов одновременно несколькими методами: органолептическим, подсчет количества бактерий в мазках-отпечатках, определение КМАФАнМ и активности каталазы разработанным методом. В процессе ухудшения качества мяса и продукции из него происходит увеличение КМАФАнМ за счёт роста бактериальных контаминантов на 6-7

порядков и увеличение активности каталазы, что проявляется в сокращении времени расщепления перекиси и исчезновении окрашивания в ряду пробирок. По результатам испытания были определены критерии времени исчезновения окрашивания в зависимости от степени свежести мяса и мясопродуктов (таблицы 3 и 4).

Таблица 3.

Зависимость между степенью свежести мяса (все виды убойных животных) охлаждённого и замороженного в тушах, полутушах, четвертинах, отрубях и уровнем активности каталазы.

Степень свежести мяса	Активность каталазы: время исчезновения окраски, мин						
	0	3	5	10	15	20	30
Свежее	+	+	+	+	+	+	+
Сомнительная свежесть	+	+	+	±/—	±/—	—	—
Несвежее	±/—	±/—	—	—	—	—	—

Таблица 4.

Зависимость между степенью свежести мяса (все виды убойных животных) обваленного и полуфабрикатов мясokостных (крупнокусковых, порционных, мелкокусковых) и уровнем активности каталазы.

Степень свежести мяса	Активность каталазы: время исчезновения окраски, мин						
	0	3	5	10	15	20	30
Свежее	+	+	+	+	+	+	+ / ± / —
Сомнительная свежесть	+	+	±/—	±/—	—	—	—
Несвежее	±/—	±/—	—	—	—	—	—

Примечание: «+» - наличие окрашивания, «—» - нет окрашивания, «±» - окрашивание менее интенсивное по цвету или исчезающее после проявления в течение 2-10 минут.

Таким образом, отмеченная нами зависимость между степенью свежести и уровнем активности каталазы исследуемого мяса легла в основу разработанного нами метода определения свежести мяса на основе определения активности каталазы бактериальных контаминантов.

Метод определения свежести мяса на основе анализа активности каталазы бактериальных контаминантов прост и чувствителен. Повышение показателя активности каталазы говорит о негативных процессах, происходящих в мясе. Этим методом можно отличить не только мясо свежее

от несвежего, но также и сомнительной свежести. Предлагаемый метод позволяет более рационально использовать мясное сырьё ещё на начальных стадиях порчи, когда органолептически оно определяется как свежее.

Разработанные нами «Методические рекомендации по определению свежести мяса на основе анализа активности каталазы бактериальных контаминантов» комиссионно апробированы и утверждены Отделением ветеринарной медицины Россельхозакадемии 27 мая 2005 г.

ВЫВОДЫ

1. Установлена возможность практического использования суммарного уровня АТФ в смывах с поверхностей производственных цехов и оборудования для контроля санитарно-гигиенического состояния мясоперерабатывающего предприятия.
2. Разработан биолюминесцентный метод по ускоренному определению санитарно-гигиенического состояния производственных поверхностей мясоперерабатывающих предприятий с помощью технологии Rida®АТФ. Метод специфичен, так как определяется АТФ всех живых бактериальных клеток и любых фрагментов (следы крови, частицы мышечной ткани)-потенциальных источников питательных веществ для последующего микробного роста; чувствителен ($0,5 \times 10^{-12}$ г АТФ); экспрессен (скорость получения результатов 2 мин); позволяет проводить оценку качества мойки и дезинфекции на предприятии.
3. Установлена высокая корреляция ($R=0,78$) между биолюминесцентным методом по определению санитарно-гигиенического состояния мясоперерабатывающих предприятий с помощью методики Rida®АТФ и стандартным бактериологическим методом определения КМАФАнМ.
4. Определены критерии содержания суммарного АТФ с помощью методики Rida®АТФ в смывах для классификации степени чистоты поверхностей технологического оборудования: «Чисто» - 0-1000 RLU/s; «Условно чисто» - 1000-2500 RLU/s; «Грязно» - >2500RLU/s.

5. Установлена прямая пропорциональная зависимость между уровнем активности каталазы, микробной контаминацией и степенью свежести мяса убойных животных. В процессе созревания мяса происходит разрушение тканевой каталазы. Затем в созревшем мясе уровень тканевой каталазы практически не изменяется. При увеличении общей микробной обсемененности и, соответственно, ухудшении качества мяса, активность каталазы возрастает в несколько раз.
6. Разработан перманганатометрический метод определения уровня активности каталазы при установлении степени свежести мяса. Определены следующие критерии уровня каталазы в мясе: «свежее» - в среднем $(8,43 \pm 5,21) \times 10^5$ мкмоль субстрата/мин, «условно свежее» - $(4,6 \pm 2,2) \times 10^6$ мкмоль субстрата/мин, «несвежее» - от $(7,21 \pm 1,69) \times 10^6$ до $(2,91 \pm 1,16) \times 10^7$ мкмоль субстрата/мин. В то же время данный метод относительно трудоёмок, что ограничивает возможность его использования в условиях производства.
7. Разработан ускоренный метод определения свежести мяса на основе анализа активности каталазы бактериальных контаминантов по скорости распада, который позволяет определить начало снижения качества мяса в результате воздействия микробных контаминантов раньше, чем обнаружатся органолептические признаки порчи. Подобрана кислота для остановки реакции, пероксидаза и краситель для её быстрого определения. Метод прост в использовании, так как не требует никакого дополнительного оборудования, экспрессен – так как можно определить условно свежее мясо за 10-20 минут (в зависимости от образца).
8. На основании проведённых исследований определены временные уровни определения активности каталазы в мясе убойных животных, которые можно использовать в качестве критериев его свежести: для «свежего» - окрашивание не исчезает в течении 30 минут, для «условно свежего» - окрашивание не выявляется через в среднем 15 мин (10-20

мин в зависимости от исследуемого образца), для «неспелого» - окрашивание не выявляется через в среднем 0-3 мин.

ПРЕДЛОЖЕНИЕ ДЛЯ ПРАКТИКИ

Для использования в научно-исследовательских учреждениях и лабораториях ветеринарно-санитарной экспертизы могут быть рекомендованы разработанные нами «Методические указания по ускоренному определению санитарно-гигиенического состояния мясоперерабатывающих предприятий с помощью метода Rida®АТФ» (утверждены Департаментом МСХ РФ 26.03.04 г. за №13-5-02/0974.) и «Методические рекомендации по определению свежести мяса на основе анализа активности каталазы бактериальных контаминантов» (утверждены Отделением ветеринарной медицины Россельхозакадемии 27.04.2005 г.).

Метод определения свежести мяса на основе анализа активности каталазы прошел производственные испытания по внедрению на базе лаборатории ветсанэкспертизы рынка ООО «МИГЕКО» и на базе производственной лаборатории ОАО «Орехово-Зуевский мясокомбинат» г. Орехово-Зуево в сентябре 2005 г.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Вишнякова И.Ю., Колесников П.С., Шурдуба Н.А. О возможности использования уровня активности каталазы в оценке степени свежести мяса. // Материалы 4-ой Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины и ветеринарно-санитарного контроля сельскохозяйственной продукции» Москва, 2002, с. 44-46.

2. Вишнякова И.Ю., Бабунова В.С., Шурдуба Н.А. Активность каталазы как показатель степени свежести мяса // В материалах 5-ой международной научно-технической конференции «Пища. Экология. Человек.». М.: МГУПБ. – 2003. – С. 221-222.

3. Вишнякова И.Ю., Бабунова В.С., Шурдуба Н.А., Галкин А.В. Экспрессный RIDA®АТФ биолюминесцентный метод для контроля уровня бактериальной контаминации поверхностей цехов и оборудования

мясокомбинатов. // Материалы XII Международного Московского конгресса по болезням мелких домашних животных, Москва 2004 г, с. 224-226.

4. Вишнякова И.Ю., Бабунова В.С., Шурдуба Н.А. Активность фермента каталазы, как показатель степени свежести мяса. // Материалы XII Международного Московского конгресса по болезням мелких домашних животных, Москва 2004 г, с. 226-227.

5. Вишнякова И.Ю., Бабунова В.С., Шурдуба Н.А. Применение метода RIDA® АТФ для определения санитарно-гигиенического состояния мясоперерабатывающих предприятий. // Материалы 5-ой Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, ветеринарно-санитарного контроля и биологической безопасности сельскохозяйственной продукции». Москва, 2004, с. 83-84.

6. Вишнякова И.Ю., Шурдуба Н.А. Активность фермента каталазы как показатель степени свежести мяса. // Практик, №2 , 2006, стр.20-22.

7. Вишнякова И.Ю. Аденозин 5`-трифосфат (АТФ) – ключевой метаболит при анализе состояния производства методом Rida®АТФ на мясоперерабатывающих предприятиях. // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии, Том 118, 2006, стр. 206 -212.

ВНИИВСГЭ, 2005 г., г. Москва, Звенигородское шоссе, д.5

Заказ 210/5

Тираж 80 экз.