

# АГРОЭКОЛОГИЯ

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ КРИТЕРИЕВ БЕЗОПАСНОСТИ И КАЧЕСТВА ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ МЯСНЫХ КОНСЕРВОВ

**Е.А. Горобчук**

Кафедра товароведения и безопасности сырья и продуктов биотехнологии  
Московский государственный университет прикладной биотехнологии  
*ул. Талалихина, 33, Москва, Россия, 109316*

Проведены исследования по определению критериев безопасности и качества на разных этапах производства мясных консервов. Были исследованы микробиологические критерии и видовой состав сырья. Показано, что на стадии приемки сырья эффективным и специфичным является метод идентификации мяса на основе иммунодиффузии, который более экономичен, чем методы на основе ПЦР-диагностики. Для анализа всех контрольных критических точек при идентификации возбудителей эффективна методика на основе амплификации с последующей ДНК-гибридизацией, которая позволяла сократить время анализа по сравнению с классическими бактериологическими методами в 2—3 раза.

При производстве мясных консервов на различных этапах технологического процесса необходимо проводить оценку показателей безопасности и качества.

Микробиологические критерии в свете Федерального закона «О техническом регулировании» являются одними из основных показателей безопасности животноводческой продукции, в том числе мясных консервов.

Важнейшим критерием оценки качества консервированного продукта являются санитарно-микробиологические показатели. Согласно СанПиН 2.3.2.1078-01 консервы, вырабатываемые в мясной отрасли, должны соответствовать требованиям промышленной стерильности для консервов группы «А».

На стадиях приемки сырья необходимо проводить идентификацию мяса, чтобы мясные консервы, их компонентный состав соответствовали требованиям технических регламентов, национальных или отраслевых стандартов, что отражено в Федеральном законе «О техническом регулировании». Тезис о «невведении в заблуждение потребителей» является одним из элементов этого закона.

Известно, что различные микроорганизмы при определенных условиях могут переходить в L-формы, при этом на различных стадиях гетероморфизма может быть затруднена индикация и идентификация микроорганизмов, конта-

минирующих консервы [1]. На отдельных этапах производства возникает необходимость проведения ускоренного анализа.

Методы ДНК-диагностики показали себя весьма специфическими и чувствительными, позволяющими проводить анализ микробных контаминаций, в том числе в термообработанной продукции [2; 3].

В настоящей работе представлены результаты исследований видового состава сырья на основе иммунодиффузии, а также данные по определению микробных контаминаций в критических контрольных точках с использованием классических микробиологических и ускоренных методов на основе ДНК и иммунодиагностики.

**Материалы и методы исследований. Методика определения видовой принадлежности мяса на основе иммунодиффузии.** Объектами исследования служили: мясное сырье (мясо в полутушах, отрубях и блочное — свинина, говядина отечественного и зарубежного производства при различных режимах подготовки к фасовке); консервы из говядины, свинины и из мяса птицы до и после стерилизации.

Для определения видовой принадлежности мяса использовали тест-системы серии ORBIT, PRIME, SOFT, PROFIT. Принцип реакции (метод иммунодиффузии по Оухтерлони) основан на диффузии диагностических антител и испытуемого антигена из пропитанных дисков в гель. При этом в случае их взаимодействия образуется полоса преципитации между противоположными дисками [4].

Компонентами анализа являются испытуемый материал (сырое мясо, мясопродукты), диски, пропитанные антителами к белкам говядины, свинины, баранины и мяса птицы, и диски сравнения, пропитанные антигеном.

От образца исследуемой продукции отбирали пробу по возможности без жира и соединительной ткани, соблюдая меры предосторожности, для предотвращения загрязнения исследуемой пробы мясным соком предыдущих проб.

Постановка реакции иммунодиффузии занимала по времени 10—20 минут (без учета времени доведения всех компонентов набора до комнатной температуры) и заключалась в следующем: на чашку с гелем пинцетами размещали в подписанные на геле зоны соответствующие диски (диск, пропитанный специфическими антителами, диски, пропитанные соответствующими антигенами, и диски, пропитанные мясным соком исследуемых образцов). Затем чашку инкубировали в термостате с постоянной комнатной температурой в течение суток. Учет и оценку результатов проводили визуально по линии преципитации между дисками с исследуемыми образцами и дисками с соответствующими специфическими сыворотками.

**Ускоренная методика определения патогенных возбудителей в мясных консервах на основе иммунохроматографии.** Определение *Salmonella typhimurium* проводили с использованием тест-полосок, пропитанных коллоидным золотом и с антителами различных эпитопов, иммобилизованными на определенных зонах.

Тест на антиген *S. typhimurium* является одноэтапным иммунохроматографическим тестом, который позволяет с высокой точностью выявить наличие мик-

роорганизмов в количестве 104 и 105. Мясо элюировали стерильным водным раствором, и тест-полоску помещали в пробирку с элюатом. Суспензия с коллоидным золотом и бактериями диффундировала до зон с частицами, покрытыми антителами. Тест-зона захватывала бактерии с определенными отдельными антигенами, позволяя окрашенным частицам концентрироваться и образовывать видимую линию (полоску). Положительный образец, содержащий бактерии со специфичными антигенами, давал видимую полоску в тест-зоне. Негативный образец не давал видимой линии в тест-зоне. В контрольной зоне полоска была видимой всегда.

Методика определения микроорганизмов на основе ПЦР с последующей ДНК-гибридизацией.

Мясо и мясные консервы элюировали стерильной бидистиллированной водой. Крупные частицы осаждали при 500G в течение 5 минут, а элюат использовали для дальнейших исследований.

Полимеразную цепную реакцию проводили с помощью комплекта для амплификации ДНК, включающего:

- смесь для ПЦР — реакционная смесь для ПЦР референс-гена;
- раствор ДНК-мишени — референс-ген,
- раствор без ДНК-мишени — отрицательный контроль ПЦР (контроль контаминации);
- Tag – pol (термостабильная ДНК-полимераза);
- гексонуклеотидный праймер.

В таком виде пробирки переносили в ячейки термоциклера, который включали по заданной программе (рис. 1).


	Время	Температура
	Начальная денатурация	1 мин 96° С
	Денатурация	20 с 95° С
	Отжиг	20 с 48° С
	Элонгация	30 с 72° С
	Окончательная элонгация	3 мин 72° С
	Выдержка	4° С

Рис. 1. Условия проведения амплификации

Полученную амплифицированную ДНК гибридизовали с иммобилизованными ДНК-зондами, специфичными для отдельных бактерий.

Исследуемую ДНК денатурировали в кипящей водяной бане в течение 5—10 мин, иммобилизовали на фильтры, предварительно обработанные раствором 10хССР в виде точек, не допуская их перекрывания. Иммобилизованную ДНК фиксировали в течение 1 ч, при 80° С. Проводили предгибридизацию и гибридизацию. При этом в качестве ДНК-зонда использовали биотинилированную ДНК. Затем фильтры отмывали от несвязавшегося зонда трехкратной обработкой по 10 мин, при комнатной температуре в промывочном растворе 1, содержащем: 50 мл 20хССР, 10 мл 10% раствора ДСН и 440 мл дистиллированной воды. Далее осуществляли промывку в промывочном растворе 2, содержащем

50 мл 20хССР, 450 мл дистиллированной воды. Проводили «забивку» фильтров в течение 40 мин при 37° С в растворе, содержащем: 25 мг сухого молока; 22 мл раствора АР7.5; 3 мл 10% желатина. Раствор АР7.5 содержал: 5 мл 1 М MgCl<sub>2</sub>; 20 мл 5 М NaCl; 75 мл 1 М трис рН 9,5 в одном литре дистиллированной воды. Затем фильтры промывали в растворе АР7.5 и помещали в 6 мл рабочего раствора конъюгата — стрептавидин-фосфатазы — на 15 мин при комнатной температуре. Фильтры промывали три раза по 10 мин в растворе АР7.5 и 1 раз в течение 5 мин в растворе АР9.5. Затем фильтры инкубировали при комнатной температуре в темноте, в течение 20—30 мин в проявляющем растворе, содержащем: 4 мл раствора АР9.5; 17,6 мкл раствора хромогена — тетразолия нитро-голубого — и 13,2 мкл раствора субстрата — бром-хлор индолит-фосфата. Результаты гибридизации оценивали визуально, по интенсивности окрашивания пятен, по сравнению с контрольными образцами.

**Результаты исследований.** При производстве мясных стерилизованных консервов выделяют 5 контрольных критических точек [5]:

- 1) входной контроль сырья и материалов при поступлении на производство;
- 2) контроль температурных режимов в производственных помещениях;
- 3) контроль консервов до стерилизации;
- 4) контроль режимов стерилизации;
- 5) контроль продукции после изготовления.

Критерии видовой принадлежности мяса не являются показателями безопасности мяса в соответствии с действующими СанПиН. Однако возможна фальсификация мяса одного вида другим, что недопустимо. Определение видовой принадлежности является обязательной характеристикой при сертификации. Фальсификации продукции, в том числе и мясной, придается особое значение в соответствии с Федеральным законом «О техническом регулировании», где особым пунктом выделена недопустимость «введения в заблуждение потребителя». Кроме того, фальсификация может влиять на этическую и религиозную специфику потребления продукции и, в частности, мясных консервов.

В результате изложенного идентификация мяса при производстве консервов является весьма важным фактором на первой стадии производства мясных консервов.

Как известно, существует достаточно много способов идентификации мяса, основанных на морфологических критериях.

Однако при поступлении блочного мяса для производства мясных консервов идентификация указанными способами затруднена из-за отсутствия конкретных морфологических критериев. В данном случае применяются гистологические, иммунологические методы и методы на основе ДНК-диагностики.

Мы проводили идентификацию блочного мяса на основе метода иммунодиффузии. Для этого исследовали поступающее мясо в соответствии с приведенной методикой. В качестве отрицательных контролей использовали мясо других видов животных.

Как видно из данных, приведенных в табл. 1, метод иммунодиффузии четко позволял идентифицировать свинину, говядину и мясо птицы, поступающие на производство мясных консервов.

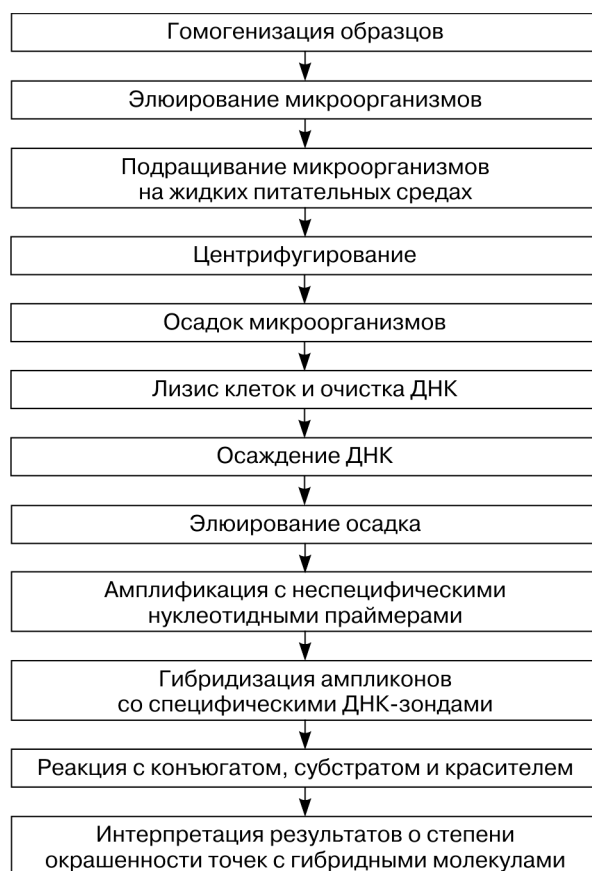
**Идентификация мяса на основе метода иммунодиффузии**

Описание образца	Специфические антитела для идентификации образцов		
	мясо кур	свинина	говядина
Импортная свинина	–	+	–
Отечественная свинина	–	+	–
Импортная говядина	–	–	+
Отечественная говядина	–	–	+
Баранина	–	–	–
Мясо кур	+	–	–
Конина	–	–	–

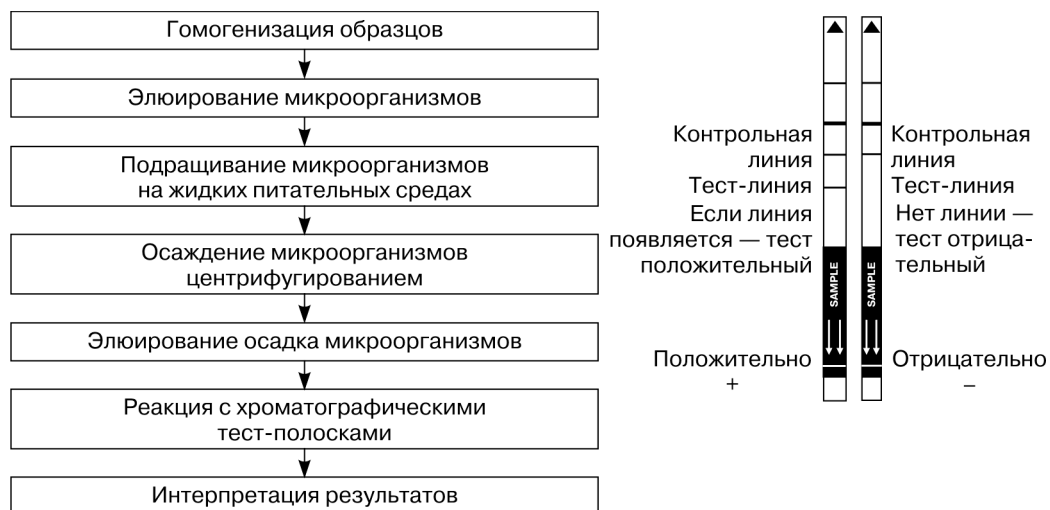
Примечание: + — положительная реакция преципитации  
 – — отрицательная реакция преципитации

Идентификацию микробных контаминаций проводили классическим микробиологическим методом, а также с помощью модифицированной методики на основе амплификации с последующей ДНК-гибридизацией и иммунохроматографическим методом.

Схема анализов представлена на рис. 2, 3.



**Рис. 2.** Схема идентификации микроорганизмов на основе амплификации с последующей гибридизацией



**Рис. 3.** Схема индикации микроорганизмов на основе иммунохроматографии

Исследуемые образцы гомогенизировали, элюировали микроорганизмы и подращивали в течение 6 часов на жидких питательных средах. Затем микроорганизмы осаждали центрифугированием, осадок элюировали в буфере для лизиса, содержащим лизоцим и протеиназу К. ДНК осаждали этанолом. Осадок элюировали в буфере для ПЦР, далее проводили амплификацию с неспецифическими нуклеотидными праймерами, мечеными биотином. Полученные ампликоны гибридизовали с иммобилизованными на нитроцеллюлозных фильтрах специфичными ДНК-зондами. После проведения гибридизации добавляли конъюгат — стрептавединфосфатазу, субстрат и краситель, как описано в методах. Результаты определяли по окрашиванию точек с гибридными молекулами.

Как видно из данных, представленных в табл. 2, методы идентификации микроорганизмов в консервах показывали сопоставимые результаты в разных критических точках и на разных этапах производства.

Таблица 2

**Результаты идентификации микроорганизмов**

Контрольные критические точки	Результаты идентификации микроорганизмов					
	Методы идентификации микроорганизмов					
	Метод 1	Метод 2	Метод 3	Метод 1	Метод 2	Метод 3
	E. coli			Salmonella typhimurium		
Входной контроль сырья и материалов при поступлении на производство	+	+	не определяли	+	+	+
Контроль температурных режимов в производственных помещениях	-	-	не определяли	-	-	-
Контроль консервов до стерилизации	+	+	не определяли	+	+	+
Контроль режимов стерилизации	-	-	не определяли	-	-	-

Продолжение

Контроль продукции после изготовления	—	—	не определены	—	—	—
---------------------------------------	---	---	---------------	---	---	---

Примечание: метод 1 — микробиологический метод  
метод 2 — амплификация с ДНК-гибридизацией  
метод 3 — иммунохроматография

### Выводы.

1. Установлено, что на стадии приемки сырья эффективным и специфичным является метод идентификации мяса на основе иммунодиффузии, который более экономичен, чем методы на основе ПЦР-диагностики.

2. Проведенные мониторинговые исследования позволили выявить до 3% сырья, контаминируемого *E. coli* и *Salmonella typhimurium*.

3. Показана сопоставимость результатов идентификации микроорганизмов различными методами (микробиологические, иммунохроматографические, амплификация с ДНК-гибридизацией). При этом иммунохроматографические методы и методы ДНК-диагностики позволяли сократить время анализа в 2—3 раза по сравнению с микробиологическими.

### ЛИТЕРАТУРА

- [1] Денисова Е.А. Разработка метода дифференциального определения вегетативных и L-форм бактерий в объектах ветеринарно-санитарного контроля и окружающей среды с использованием ДНК-гибридизации // Сб. науч. тр. ВНИИВСТЭ. — 2001. — Т. 111. — С. 69—73.
- [2] Гицбург А.Л. Генодиагностика инфекционных заболеваний // Журнал микробиологии, эпизоотологии и иммунологии. — 1998. — № 3. — С. 86—95.
- [3] Бычкова И.Б. Сравнение эффективности молекулярно-биологических и культуральных методов при контроле качества пищевых продуктов // Свиноферма. — 2006. — № 6. — С. 45.
- [4] Ouchterlony O. // Progress in Allergy. — 1958. — V. 6. — P. 30.
- [5] Шукина М.А. Микробиологические характеристики как критический фактор оценки безопасности производства мясных стерилизованных консервов в системе ХАССП. — Автореф. дис. ... канд. тех. наук. — М.: ГНУ ВНИИМП. — 2007.

## DETERMINATION OF SAFETY AND QUALITY CRITERIA IN PRODUCING CANNED MEAT

E.A. Gorobchuk

Department of commodity research and safety of raw materials and products of biotechnology  
Moscow state university of applied biotechnology  
33, Talalikhina str., Moscow, Russia, 109316

The researches have been carried out to determine the criteria of safety and quality at different production phases of canned meat. Microbiological criteria and specific structure of raw material have been observed. It is shown that at the stage of acceptance of raw materials the method of identification of meat on the basis of immunodiffusion is effective and specific, it is more economic than methods on the basis of PCR-diagnostics. For the analysis of all control critical points while identifying pathogens the technique on the basis of amplification from subsequent DNA-hybridization is effective which has been allowed the time reduction of the analysis in comparison with classical bacteriological methods in 2—3 times.