

На основе полученных данных были построены следующие графики (рисунки 2, 3).

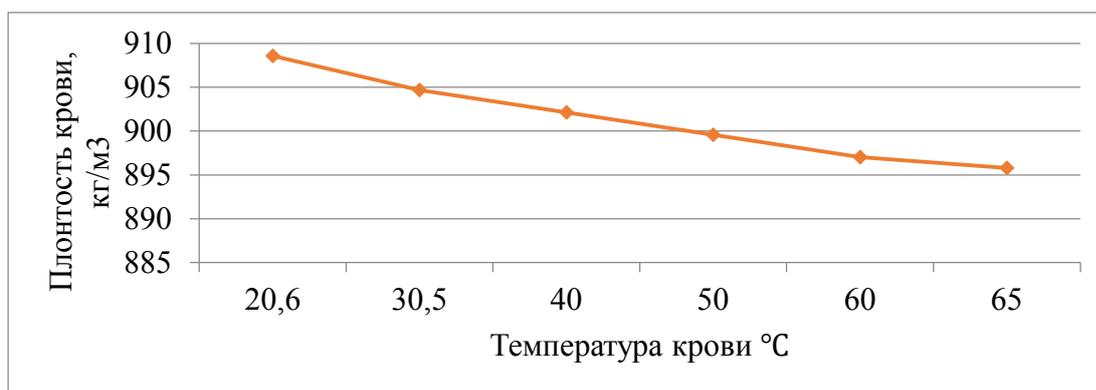


Рисунок 2 - График зависимости плотности крови от температуры.

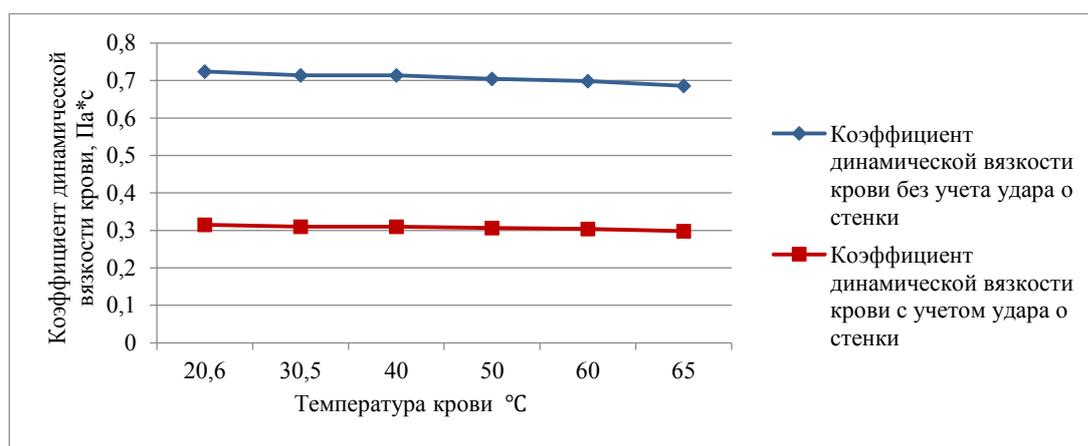


Рисунок 3 - График зависимости коэффициента динамической вязкости от температуры.

Выводы

1. Определены зависимости плотностей и коэффициентов динамической вязкости крови КРС от температуры.

2. Полученные данные для динамической вязкости крови и сравнение их с литературными данными показывают, что метод определения их с учетом касания стенок шариком является в нашем случае наиболее достоверным.

Список литературы:

1. Максимов Д.А. Электрофизические методы обработки крови убойных животных / Д.А. Максимов, П.И. Пляшешник, А.В. Теуважев, В.В. Панков // Мясная индустрия. – 2013. №4. С. 40-43.
2. Стефанова И.Л. Исследование влияния термической обработки на состав и выход коагулированного яичного белка с целью создания новых видов специализированных высокобелковых яичных продуктов пониженной калорийности / И.Л. Стефанова, Л.В. Шахназарова, А.Ю. Клименкова, С.С. Козак // Птица и её переработка: проблемы, опыт, решения. Продукты птицеводства – яйцо. Дайджест. Выпуск 13(277). – Ржавки: 2016. – 32 с.; стр. 9.
3. Ивашов В.И. Современные коагуляторы для технической крови / В.И. Ивашов, Д.А. Максимов, П.И. Пляшешник // Мясная индустрия. – 2013. №5. С. 58-64.
4. Ивашов В.И., Пляшешник П.И., Каповский Б.Р., Захаров А.Н., Максимов А.Ю. Энергоэффективная установка для коагуляции крови. Международная научно-практическая конференция, посвященная памяти Василия Матвеевича Горбатова. -2016. -№ 1. -С. 138-139.
5. Иванов А.М. К вопросу о переработке крови / А.М. Иванов, Н.С. Николаев, П.И. Пляшешник // Сборник материалов XV научно-практической конференции с международным участием «Живые системы», 2017. С. 176-177.
6. Иванов А.М. Исследование физических свойств крови крупного рогатого скота / А.М. Иванов, Н.С. Николаев, П.И. Пляшешник // Научно-практическая конференция с международным участием «Пища и человек», 2018. С. 167-170.

ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ ВЕЩЕСТВ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В ПОБОЧНЫХ ПРОДУКТАХ УБОЯ СВИНЕЙ

Полищук Е.К., Котенкова Е.А., к.т.н.

ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН

Ключевые слова: *побочные продукты убоя, антимикробные вещества, проточная цитометрия, слизистые оболочки, свинья*

Введение

Урбанизация, стремительный рост мирового населения и повышение его благосостояния требуют более эффективного использования существующих сырьевых источников, в особенности мяса. Данная тенденция отображена в концепции устойчивого развития производства продуктов питания. По оценкам Продовольственной и сельскохозяйственной организации Объединенных Наций (FAO) к 2050 году глобальный спрос на мясные продукты увеличится примерно в два раза [1]. Прогнозируемое увеличение производства мяса приведет к сопутствующему увеличению объемов образования субпродуктов, побочных продуктов убоя и биологических отходов. Стоит отметить, что на 2013 год доля отходов мясной

промышленности в Российской Федерации составляла около 40% при производстве свинины [2], которая наиболее широко потребляется [3]. Несмотря на то, что большинство побочных продуктов убоя по питательной ценности не уступает мясу, а по содержанию витаминов и микроэлементов даже превосходит [4], значительная часть не перерабатывается. Следовательно, в настоящее время перед отраслью и научным сообществом остро стоит вопрос о рационализации переработки побочных продуктов убоя.

Сегодня лишь часть побочных продуктов убоя крупного рогатого скота и свиней могут использоваться в колбасном производстве (кишки в качестве оболочки для колбасных изделий), производстве желатина (шкура, кость и другие коллагенсодержащие побочные продукты), красителей (гемоглобин, выделенный из крови), а также в производстве белковых функциональных препаратов (плазма крови). При этом многие побочные продукты убоя утилизируют, хотя они имеют большой потенциал для применения. Известно, что любая животная ткань характеризуется специфичным протеомным составом, который определяет ее биологическую функцию в организме.

В связи с этим интересными для изучения являются биологически активные вещества, содержащиеся в тканях животных. Учеными установлено, что пограничные зоны эпителиальных покровов, ввиду их интенсивного контакта с широким спектром разнообразных агрессивных биологических агентов (патогенные и оппортунистические микроорганизмы, вирусы, грибы), содержат набор веществ с антимикробной направленностью действия [5–11] – антимикробные пептиды (АМП), гистоны, лизоцим и т.д. [12, 13]. О существовании АМП известно уже более шестидесяти лет [6], и в течение последних десяти лет исследователи наиболее активно занимаются их изучением. Большинство АМП млекопитающих были выделены из нейтрофильных гранулоцитов, однако они также обнаружены в меньшем количестве в слизистой тонкого кишечника, языка, миелоидных и эпителиальных клетках.

В соответствии с данными The Antimicrobial Peptide Database, ткани крупного рогатого скота характеризуются содержанием большого количества дефенсинов [14–16] и кателицидинов [17, 18], обладающих антимикробным действием против грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также противовирусными и противогрибковыми свойствами. В тканях же свиньи преобладают такие антимикробные вещества как протегрины [19–22], которые гомологичны по своему аминокислотному составу и характеризуются высокой антимикробной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий [8].

Поэтому целью настоящей работы было изучение антимикробного потенциала биологически активных веществ, содержащихся в слизистых оболочках свиней.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования выбраны слизистые оболочки гортани (образец 1), языка (образец 2), губ (образец 3), носовой полости (образец 4), прямой кишки (образец 5), а также подъязычные слюнные железы (образец 6) свиней. Образцы отбирали на ООО "Камский Бекон", Республика Татарстан, г. Набережные Челны. Слизистые отделяли от сопутствующих тканей, замораживали при минус 40 °С (не позднее 2-х часов после отбора). Для исследования образцы в замороженном виде измельчали (до размера частиц диаметром 3±1 мм) и экстрагировали: к навеске образца массой 7 г приливали 35 мл 10%-го раствора уксусной кислоты и выдерживали при 4-5 °С на 10 часов. По окончании процесса экстракты центрифугировали (Sigma 3K30, Германия) при 15000 об/мин и 4,0 °С, в течение 5 мин, отбирали надосадочную жидкость. Супернатант нейтрализовали 4 М раствором гидроксида натрия до pH=6, часть нейтрализованных экстрактов подвергали ультрафильтрации на центрифужных ультрафильтрах Амикон Ультра-4 (50КДа, Millipore).

Протеомный профиль нативных тканей выбранных слизистых оболочек различной локализации изучали с помощью двумерного электрофореза по методу О'Фаррелла и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Двумерный электрофорез (2ДЭФ) проводился с изоэлектрофокусированием в амфолиновом градиенте pH (IEF-PAGE). Детекцию белков на двумерных электрофореграммах осуществляли окрашиванием CBV R-250 и азотнокислым серебром. Идентификацию проводили 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 аутолиза трипсина. Анализ тканеспецифичного пептидного профиля экстрактов в сравнении с соответствующей мышечной тканью проводили на системе высокоэффективной жидкостной хроматографии с трехкварупольным масс-спектрометром (жидкостной хроматограф AGILENT 1200 C (Agilent Technologies, США) с масс-селективным детектором AGILENT 6410 (Agilent Technologies, США)).

Определение антимикробной активности образцов экстрактов и ультрафильтратов (Мм менее 50 кДа) по отношению к *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* проводили на проточном цитометре Guava EasyCyte (MerkMillipore, Германия). Для этого образец в количестве 10 мкл смешивали с 90 мкл культуры (10⁶ кл/мл) и инкубировали 12 часов при 37°С. Для определения числа живых клеток к 20 мкл смеси добавляли 5 мкл красителя Eva Green, 365 мкл деионизированной воды и 10 мкл DMSO, инкубировали в темноте 10-15 мин и проводили анализ. Для измерения количества мертвых клеток к 20 мкл смеси добавляли 3 мкл красителя PI (пропидия йодид), 377 мкл 0,9% раствора натрия хлорида, инкубировали в темноте 10-15 мин, после чего проводили анализ.

Результаты и обсуждения

В результате протеомного исследования в анализируемых образцах было обнаружено множество гистонов разных типов (H2B type 1-like, HIST1H2BV, HIST1H2BB, HIST1H2BB, H2B ½, H2B type 1-N и HIST1H2BV), которые сами обладают антимикробной активностью, а также могут вносить большой вклад в образование пептидов, лизоцим С, разрушающий клеточные стенки бактерий. Также были идентифицированы белок S100-A12, участвующий в антимикробном гуморальном иммунном ответе опосредованном антимикробными пептидами, и белок AGR2, играющий роль в производстве слизи, миграции, дифференциации и росте клеток, а также способствующих их адгезии.

Анализ пептидного профиля тканей методом ВЭЖХ показал высокую специфичность исследуемого сырья в сравнении с соответствующей мышечной тканью. Наибольшее количество пептидов, характерных только для одного типа ткани было обнаружено в слизистых оболочках прямой кишки и гортани (51 и 52 соответственно).

В ходе определения антимикробной активности нативных образцов по отношению к *Pseudomonas aeruginosa* (табл. 1) наблюдалось увеличение числа живых клеток, однако доля сохранившихся мертвых

клеток (прокрашивались PI) достигала 40% от всех клеток, что предположительно связано с «упаковкой» АМП в белковую молекулу [5, 7], которая изначально может использоваться микроорганизмами как субстрат, и только при высвобождении оказывать антимикробное действие. Предположение подтверждалось тем, что в ультрафильтрах такого эффекта не наблюдалось. Отмечено, что антимикробная активность практически всех УФ при удалении высокомолекулярных веществ возрастала. Ультрафильтрация в отношении экстрактов слизистых оболочек гортани, языка, носовой полости, прямой кишки и подъязычных слюнных желез приводила к увеличению активности, в случае слизистой оболочки губ – не оказывала влияния на активность.

Таблица 1. Результаты определения антимикробной активности по отношению к *Pseudomonas aeruginosa* нативных образцов и образцов после УФ методом проточной цитометрии с использованием красителей Eva Green и PI

Образец	Нативные		после УФ (Мм менее 50 кДа)	
	выжившие клетки (по отношению к контролю)	доля мертвых клеток (по отношению к сохранившимся клеткам)	выжившие клетки (по отношению к контролю)	доля мертвых клеток (по отношению к сохранившимся клеткам)
Слизистая гортани	186,4%	31,8%	43,9%	11,5%
Слизистая языка	203,3%	32,2%	49,7%	3,3%
Слизистая губ	265,8%	0,6%	198,9%	0,3%
Слизистая носовой полости	109,0%	1,4%	54,6%	4,7%
Слизистая прямой кишки	212,2%	39,7%	50,0%	8,2%
Подъязычные слюнные железы	116,6%	5,4%	47,9%	3,0%

Результаты изучения антимикробной активности по отношению к *Staphylococcus aureus* нативных экстрактов и ультрафильтратов представлены в таблице 2. Активностью обладали практически все нативные образцы, наибольшее антимикробное действие было отмечено у экстракта слизистой оболочки губ, доля выживших клеток не превышала 4%. Увеличение количества клеток более чем в 1,5 раза наблюдалось при добавлении экстракта слизистой прямой кишки, однако в этом образце отмечалось аналогичное наблюдение, что и в отношении *Pseudomonas aeruginosa*: доля сохранившихся мертвых клеток (прокрашивались PI) достигала 46,5% от всех клеток

Таблица 2. Результаты определения антимикробной активности по отношению к *Staphylococcus aureus* нативных образцов и образцов после УФ методом проточной цитометрии с использованием красителей Eva Green и PI

Образец	Нативные		после УФ (Мм менее 50 кДа)	
	выжившие клетки (по отношению к контролю)	доля мертвых клеток (по отношению к сохранившимся клеткам)	выжившие клетки (по отношению к контролю)	доля мертвые клетки (по отношению к сохранившимся клеткам)
Слизистая гортани	29,6%	70,6%	16,4%	20,2%
Слизистая языка	32,4%	29,7%	19,4%	13,2%
Слизистая губ	3,3%	38,8%	5,4%	3,8%
Слизистая носовой полости	26,5%	20,2%	48,5%	8,3%
Слизистая прямой кишки	160,7%	46,5%	14,4%	19,7%
Подъязычные слюнные железы	6,0%	21,1%	15,3%	10,6%

Сравнивая полученные результаты с результатами эксперимента с *Pseudomonas aeruginosa*, стоит отметить, что количество выживших клеток стафилококка гораздо меньше, доля мертвых клеток также превышает предыдущие результаты, что свидетельствует о более высокой активности образцов относительно грамположительных бактерий.

Заключение

Протеомными исследованиями было выявлено, что слизистые оболочки свиней обладают высокой

тканевой специфичностью и содержат вещества антимикробной направленности, среди которых гистоны различных типов, лизоцим С, фракции белков AGR2 и S100-A12. Скрининг антимикробной активности выбранных образцов с помощью метода проточной цитометрии по отношению к *P. aeruginosa* и *S. aureus* показал, что экстракты слизистых свиной обладают большей активностью в отношении грамположительных, нежели грамотрицательных бактерий. Отмечено увеличение количества живых клеток бактерий, это может быть связано с тем, что АМП «упакованы» в белковой молекуле. По данным международной базы UniProt Protein Database, антимикробные пептиды содержатся в живом организме чаще всего в виде препробелка, то есть содержат в себе «проструктурную область», сигнальный пептид и сам зрелый активный пептид [5, 7]. Соответственно, чтобы получить зрелый пептид, необходимо «распаковать» молекулу, что осуществимо с помощью различных протеолитических ферментов в зависимости от требуемого строения получаемого антимикробного пептида. В ультрафильтрах образцов увеличения числа живых клеток бактерий не наблюдалось, что свидетельствует об очистке экстрактов от менее эффективных высокомолекулярных соединений. В отношении грамотрицательных бактерий наибольшую активность проявляли ультрафильтраты экстрактов слизистых оболочек гортани – 43,9 %, языка – 49,7 % и прямой кишки – 50 % оставшихся живых клеток. В отношении грамположительных бактерий наиболее активными были нативные экстракты губ – 3,3 % и подязычных слюнных желез – 6 % оставшихся живых клеток; ультрафильтраты всех образцов обладали высокой активностью по отношению к стафилококку.

Полученные в ходе исследований результаты позволяют рассматривать побочные продукты убоя свиной, в частности слизистые оболочки, в качестве источников веществ антимикробной направленности, что будет способствовать сокращению отходов в мясной промышленности и рационализации их переработки.

Благодарности

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-76-10033).

Список литературы:

1. FAO's Director-General on How to Feed the World in 2050 // Population and Development Review. 2009. Vol. 35(4). P. 837-839. doi:10.1111/j.1728-4457.2009.00312.x
2. ИТС 43-2017 Убой животных на мясокомбинатах, мясохладобойнях, побочные продукты животноводства [Электронный ресурс] // Электронный фонд правовой и нормативно-технической документации URL: <http://docs.cntd.ru/document/556173712> (дата обращения: 15.09.2018).
3. Namawand I., Pittaway P., Lewis L., Chakraborty S., Caldwell J., Eberhard J., Chakraborty A. Waste management in the meat processing industry: Conversion of raunch and DAF sludge into solid fuel // Waste Management. 2017. Vol. 60. P. 340-350.
4. Дашкин Э.А., Турлубаева А.Н. Субпродукты как основа здорового питания // Всероссийская научно-методическая конференция «Университетский комплекс как региональный центр образования, науки и культуры», Оренбург 2013.
5. Лукинова Е.А., Котенкова Е.А., Макаренко А.Н. Антимикробные вещества: альтернативный подход к продлению сроков хранения // Теория и практика переработки мяса. -2017. -Т. 2. -№ 3. -С.4-17.
6. Азимова В.Т., Потатуркина-Нестерова Н.И., Нестеров А.С. Эндогенные антимикробные пептиды животного происхождения [Электронный ресурс] // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 6. С. 588-588. URL: <http://www.science-education.ru/pdf/2015/6/115.pdf> (Дата обращения: 16.09.2018).
7. UniProt Protein Database [Электронный ресурс]. URL: <http://www.uniprot.org/> (Дата обращения: 16.09.2018).
8. The Antimicrobial Peptide Database [Электронный ресурс]. URL: <http://aps.unmc.edu> (Дата обращения: 16.09.2018).
9. Кулакова Е.В., Елизарова В.М., Пампура А.Н. Эндогенные антимикробные полипептиды-факторы неспецифической защиты организма // Российский стоматологический журнал. 2012. № 6. С. 42-45.
10. Shi J. et al. Antibacterial activity of a synthetic peptide (PR-26) derived from PR-39, a proline-arginine-rich neutrophil antimicrobial peptide // Antimicrob. Agents Chemother. 1996. Vol. 40, № 1. P. 115-121.
11. Mor A., Nicolas P. Isolation and structure of novel defensive peptides from frog skin // Eur. J. Biochem. 1994. Vol. 219. P. 145-154.
12. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms // Nature. 2002. Vol. 415(6870). P. 389-395.
13. Lehrer R. I., Ganz T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence // Current opinion in immunology. 1999. Vol. 11(1). P. 23-27.
14. Aono S., Li C., Zhang G., Kemppainen R., Gard J., Lu W., Hu X., Schwartz D., Morrison E., Dykstra C., Shi J. Molecular and functional characterization of bovine beta-defensin-1 // Veterinary immunology and immunopathology. 2006. Vol. 113 (1-2). P. 181-190.
15. Selsted M., Tang Y-Q., Morris W., McGuire P., Novotny M., Smith W., Henschen A., Cullor J. Purification, primary structures, and antibacterial activities of beta-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils // Journal of Biological Chemistry. 1993. Vol. 268 (9). P. 6641-6648.
16. Diamond G., Zasloff M., Eck H., Brasseur M., Maloy W., Bevins C. Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1991. Vol. 88 (9). P. 3952-3956.
17. Selsted M.E., Novotny M.J., Morris W.L., Tang Y.Q., Smith W., Cullor J.S. Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils // Journal of Biological Chemistry. 1992. Vol. 267 (7). P. 4292-4295.
18. Romeo D., Skerlavaj B., Bolognesi M., Gennaro R. Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils // Journal of Biological Chemistry. 1988. Vol. 263 (20). P. 9573-9575.
19. Tamamura H, Murakami T, Horiuchi S, Sugihara K, Otaka A, Takada W, Ibuka T, Waki M, Yamamoto N, Fujii N. Synthesis of protegrin-related peptides and their antibacterial and anti-human immunodeficiency virus activity // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 1995. Vol. 43(5). P. 853-858.
20. Storici P, Zanetti M. A novel cDNA sequence encoding a pig leukocyte antimicrobial peptide with a cathelin-like pro-sequence // Biochemical and biophysical research communications. 1993. Vol. 196(3). P. 1363-1368.
21. Kokryakov V., Harwig S., Panyutich E., Shevchenko A., Aleshina G., Shamova O., Korneva H., Lehrer R. Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins // FEBS letters. 1993. Vol. 327(2). P. 231-236.
22. Zhao C., Ganz T., Lehrer R. The structure of porcine protegrin genes // FEBS Letters. 1995. Vol. 368. P. 197-202.

МЕТОД ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ИЗМЕНЕНИЯ КАЧЕСТВА КАКАОСОДЕРЖАЩИХ ПОЛУФАБРИКАТОВ ПО ИХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ОБСЕМЕНЕННОСТИ И КИСЛОТНОСТИ

Полякова С.П., к.т.н., Пестерев М.А., Баженова А.Е.

ВНИИКП – филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, Россия, Москва

Ключевые слова: Глазури, срок хранения, липолитические микроорганизмы, кислотность, бактериальная микробиота, кондитерские полуфабрикаты

Кондитерские изделия представляют собой многокомпонентные сложные физико-химические системы. Прогнозирование и обеспечение уровней микробиологических показателей и показателей окислительной порчи кондитерских изделий в течение полного «жизненного цикла» – одна из актуальных проблем кондитерской отрасли. В процессе полного «жизненного цикла» кондитерских изделий, включающего производственные процессы, хранение и реализацию, происходят сложные физико-химические взаимодействия их компонентов, в том числе изменение состояния воды, микробиологические, ферментативные и окислительные процессы, а также взаимодействие продуктов окисления с компонентами