

УДК 539.1.047

ПРИМЕНЕНИЕ НИЗКОЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕКТРОНОВ ДЛЯ АНТИМИКРОБНОЙ ОБРАБОТКИ МЯСА ПТИЦЫ

© 2020 г. А. П. Черняев^{1,2}, В. В. Розанов¹, М. К. Беклемишев³, У. А. Близнак^{1, *},
В. С. Ипатова¹, В. М. Авдюхина¹, П. Ю. Борщеговская¹, И. К. Гордонова⁴,
Е. А. Рукосуева³, В. В. Ханкин², Д. С. Юров²

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, физический факультет, Москва, Россия

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Научно-исследовательский институт ядерной физики имени Д.В. Скобельцына, Москва, Россия

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия

⁴Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
“Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений”, Москва, Россия

*E-mail: uabliznyuk@gmail.com

Поступила в редакцию 18.06.2020 г.

После доработки 10.07.2020 г.

Принята к публикации 27.07.2020 г.

В рамках выполнения цикла комплексных исследований, направленных на оптимизацию применения радиационных технологий для стерилизации и обработки биообъектов, выявлена нелинейная зависимость микробиологических показателей охлажденного мяса индейки от мощности дозы воздействующего электронного излучения в диапазоне доз от 0.25 до 6 кГр. Флуориметрический метод “отпечатков пальцев” в исследуемом диапазоне доз не выявил значимых различий для облученных и необлученных образцов.

DOI: 10.31857/S0367676520110071

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время наблюдается рост применения радиационных технологий в различных областях науки и индустрии, таких, как медицина, сельское хозяйство и пищевая промышленность, синтез и модификация материалов, построение систем неразрушающего контроля и многое другое [1, 2].

Использование ионизирующих излучений является одним из наиболее эффективных и универсальных методов продления срока годности пищевых продуктов, позволяющих обеспечить их санитарную безопасность [3–5], что особенно актуально в связи с постоянным ростом заболеваемости, вызванной пищевыми отравлениями из-за некачественных или просроченных продуктов [6]. С другой стороны, по существующим оценкам сегодня мировые потери при переработке, транспортировке и хранении (как качественные, так и количественные) составляют практически треть от объемов производимой продукции [7], что представляет собой реальную угрозу как региональной, так и глобальной продовольственной безопасности.

Использование радиационных технологий регламентируется в соответствии с национальными нормативами. При использовании радиационного воздействия в пищевых технологиях значения допустимых доз в разных странах существенно различаются. Например, в Голландии и Бельгии максимально допустимая доза – 10 кГр, во Франции – 11 кГр, в США – до 30 кГр. Рекомендации МАГАТЭ устанавливают три возможных диапазона, включающих значения от 4 до 50 кГр [8]. В Российской Федерации для каждого вида обрабатываемой продукции действуют отдельные специальные нормативные документы – в частности для мяса и мясопродуктов – ГОСТ 33820–2016 “Мясо свежее и мороженое. Руководство по облучению для уничтожения паразитов, патогенных и иных микроорганизмов”. Существуют отдельные ГОСТы для радиационной обработки рыбы и морепродуктов, продукции сельскохозяйственного производства и прочие [9].

Вместе с тем постоянно растущий спрос требует непрерывного развития и совершенствования этих важнейших технологий. На сегодняшний

день ведутся многочисленные исследования по влиянию различных параметров радиационной обработки на сельскохозяйственную и пищевую продукцию [10–15]. Особенно важным является поиск “рабочего окна” доз для конкретного типа продукции, при котором происходит достаточное ингибирование болезнетворной микрофлоры, но еще не происходят существенные нарушения биохимических и органолептических показателей.

Физико-химическая стадия воздействия радиации приводит к возникновению свободных радикалов, активно вступающих в различные химические реакции [16]. Биохимические процессы, запускаемые ионизирующим излучением, оказывают влияние на сложные органические соединения, находящиеся в продуктах, а именно на белки, липиды и углеводы, ускоряя их окислительные процессы, разрушают аминокислоты (метионин, цистеин, гистидин и др.) и витамины группы В [17, 18]. Различные методы, такие как ЭПР-анализ [19–21], фотолюминесцентные (PSL) и термолюминесцентные (TL) методы [22, 23], метод TBARS [24, 25] и другие, позволяют количественно измерить химические изменения в продукте и, тем самым, оценить отклик системы на воздействие излучения.

Для сравнения и классификации объектов, имеющих близкий состав, (например, для различения образцов, подвергавшихся и не подвергавшихся радиационной обработке), целесообразно было бы изучить вопрос перспективности использования методов “отпечатков пальцев”, основанных на получении спектров различной природы, хроматограмм или данных с электрохимических сенсоров с их последующей обработкой методами математической статистики [26–29].

На физическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова при активном участии ученых НИИЯФ им. Д.В. Скобельцына, химического факультета МГУ и ВИЛАР ведутся комплексные исследования, главной целью которых является оптимизация технологий радиационной обработки биообъектов [30–32].

В данной работе представлены результаты исследования воздействия разных доз и мощностей доз облучения электронами с энергией 1 МэВ на микробиологические показатели охлажденного мяса индейки, а также выявление химических изменений в обработанной различными дозами продукции с использованием метода “отпечатков пальцев”.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали мясо охлажденной индейки, хранившееся два дня после выработки при температуре 2°C. Для оценки микробиологических показателей были подготовлены образцы массой 0.30 ± 0.05 г и раз-

мерами $6 \times 6 \times 6$ мм, помещенные в стерильные пластиковые пробирки типа Эппендорф объемом 2 мл для дальнейшего облучения. Для проведения химического и микробиологического анализа к измельченной мышечной ткани индейки добавляли физиологический раствор в соотношении 1 : 3. Полученную смесь гомогенизировали до однородной суспензии (гомогената). Далее 0.5 мл гомогената помещали в пластиковые стерильные пробирки объемом 2 мл для проведения дальнейших исследований. Все описанные выше процедуры проводили в асептических условиях. Подготовка образцов и их облучение проводились при температуре 18–20°C.

Образцы облучали на промышленном ускорителе электронов УЭЛР-1-25-Т-001 с энергией 1 МэВ. Расстояние от выхода пучка до дюралюминиевой пластины, на которой располагались исследуемые образцы, составляло 12 см. В каждом сеансе облучения фиксировался общий заряд, поглощаемый пластиной, ток пучка и время облучения. Для достижения равномерности дозы в исследуемом объекте образцы в виде кусков облучали с двух противоположных сторон. Облучение проводилось пятью различными дозами в диапазоне от 0.25 до 6 кГр при мощностях дозы 1, 10 и 100 Гр/с. В ходе исследования мощность облучения варьировали изменением тока пучка электронов, энергия частиц оставалась неизменной. Контрольные образцы находились в тех же условиях, что и образцы, подвергшиеся воздействию ионизирующего излучения.

Расчет поглощенной дозы в образцах индейки был произведен при помощи компьютерного моделирования с использованием программного кода GEANT 4, в основе работы которого лежит метод Монте-Карло, с учетом измеренного поглощенного заряда, а также технических характеристик ускорителя электронов и параметров облучения (табл. 1 и 2). Контроль дозы во время облучения проводился с использованием стандартного образца поглощенной дозы, на основе радиохромных пленок, для фотонного и электронного излучений (сополимер с 4-диэтиламиноазобензоловым красителем) “СО ПД(Э)-1/10” [33]. Для проверки алгоритма расчета дозы, поглощенной образцами, моделировалась дозиметрическая пленка, в качестве модели использовался водный параллелепипед шириной 11 мм, длиной 44 мм и толщиной 0.5 мм, в котором рассчитывалась поглощенная доза. Разница между дозой, измеренной пленочным дозиметром и дозой, поглощенной водным фантомом, составила менее 12%.

Для исследования воздействия облучения на химические показатели гомогената индейки использовали образцы, обработанные при мощности 10 Гр/с. Измерение флуоресценции 6 облученных и 6 необлученных образцов производилось в отсутствие и при наличии дополнительно

Таблица 1. Параметры облучения мяса охлажденной индейки

<i>N</i>	<i>t</i> , с	<i>I</i> , нА	<i>Q</i> , нКл	<i>D</i> , кГр	<i>P</i> , Гр/с
1	254 ± 1	60 ± 10	12970 ± 270	0.25 ± 0.01	1.07 ± 0.03
2	953 ± 1		52300 ± 1100	1 ± 0.04	
3	1883 ± 1		104190 ± 2200	2 ± 0.08	
4	2860 ± 1		152090 ± 3220	3 ± 0.1	
5	5551 ± 1		307000 ± 6180	6 ± 0.2	
6	24 ± 1	600 ± 50	13220 ± 290	0.25 ± 0.01	9.8 ± 0.3
7	111 ± 1		52380 ± 1100	1 ± 0.04	
8	225 ± 1		104500 ± 2200	2 ± 0.08	
9	283 ± 1		152140 ± 3220	3 ± 0.1	
10	559 ± 1		311800 ± 6180	6 ± 0.2	
11	2 ± 0.5	6000 ± 100	14130 ± 290	0.25 ± 0.01	92 ± 2
12	10 ± 1		52660 ± 1110	1 ± 0.04	
13	24 ± 1		103500 ± 2190	2 ± 0.08	
14	31 ± 1		154560 ± 3270	3 ± 0.1	
15	59 ± 1		314000 ± 6190	6 ± 0.2	

Таблица 2. Параметры облучения гомогената индейки

<i>N</i>	<i>t</i> , с	<i>I</i> , нА	<i>Q</i> , нКл	<i>D</i> , кГр	<i>P</i> , Гр/с
1	90 ± 1	450 ± 50	11480 ± 240	0.25 ± 0.01	11.2 ± 0.2
2	94 ± 1		23000 ± 460	0.5 ± 0.02	
3	125 ± 1		46030 ± 970	1 ± 0.04	
4	222 ± 1		91840 ± 1900	2 ± 0.08	
5	364 ± 1		128022 ± 2710	3 ± 0.1	
6	980 ± 1		460280 ± 10100	10 ± 0.3	

вводимого флуорофора (трис-бипиридилата рутения(2+)). Обработанные на ультразвуковом гомогенизаторе Sonopuls (Bandelin, ФРГ) образцы разбавляли водой в 40 раз и 60 мкл полученных растворов помещали в ячейки 96-луночного полистирольного планшета. Для исследования в присутствии флуорофора в ячейки поместили также 30 мкл $1.4 \cdot 10^{-5}$ М раствора Ru(bpy)₃Cl₂ (Sigma, bpy = 2.2'-бипиридил). Во всех случаях объем раствора в ячейках доводили водой до 300 мкл. Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Agilent, США) при возбуждении светом с длиной волны

450 нм (напряжение на ФЭУ – 800 В, ширина щели – 10 и 5 нм, шаг длины волны – 1 нм). Результаты обрабатывали методом главных компонент [34] в программе Unscrambler X (Camo Analytics).

Полученные спектры были зашумлены, поэтому к ним применялся метод сглаживания по Савицкому-Голаю [35], который сохраняет все особенности экспериментальных спектров, делая их более пригодными к дальнейшей обработке. Процедура сглаживания производилась с помощью встроенных возможностей программы Origin v. 8.5.

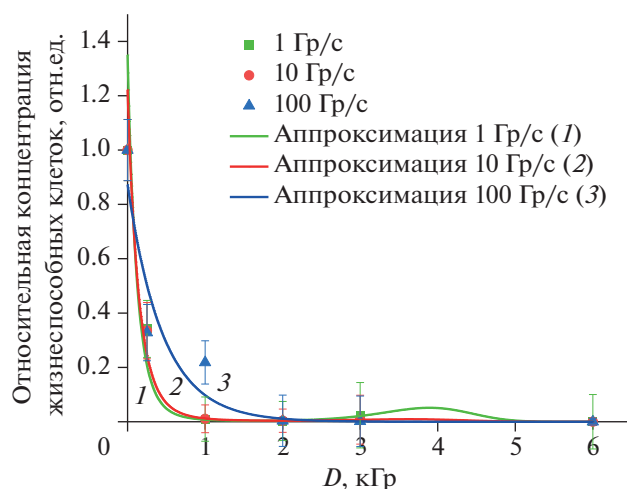


Рис. 1. Зависимости относительной концентрации жизнеспособных клеток в охлажденной индейке после воздействия электронами с мощностями дозы 1, 10 и 100 Гр/с от дозы облучения. 1, 2 и 3 – аппроксимации электронного излучения с мощностями дозы 1, 10, и 100 Гр/с, соответственно.

Для исследования воздействия дозы и мощности дозы облученные и контрольные образцы го-могената разбавляли в физиологическом растворе в 2–10000 раз. После разбавления по 0.1 мл суспензии наносили на поверхность питательной агаризованной тиогликолевой среды в чашки Петри. Концентрацию жизнеспособных клеток в облученных и необлученных образцах определяли через сутки после облучения и выражали в КОЕ/г.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате эксперимента было установлено, что при воздействии ускоренными электронами с энергией 1 МэВ при мощностях дозы 1–100 Гр/с концентрация жизнеспособных микроорганизмов в мясе индейки нелинейно уменьшалась с увеличением дозы облучения в диапазоне доз от 0.25 до 6 кГр. На рис. 1 показана зависимость концентрации жизнеспособных клеток в образцах от дозы через день после облучения при мощности

дозы 1, 10 и 100 Гр/с. Из рис. 1 видно, что для мощностей доз 1 и 10 Гр/с наиболее эффективными для подавления патогенной микрофлоры оказались дозы 0.25 и 1 кГр, в свою очередь, при мощности дозы 100 Гр/с большее снижение количества жизнеспособных клеток наблюдалось при дозе 3 кГр. Для дозы 2 кГр не выявлено статистических различий в обработке с мощностями доз в диапазоне от 1 до 100 Гр/с. Зависимость биологического эффекта от дозы и мощности дозы облучения связана не только с радиочувствительностью различных популяций бактерий, населяющих мясо птицы, их скоростью размножения и скоростью потребления питательной среды, взаимной конкуренцией, но также определяется физическими параметрами облучения, таких, как энергия частиц, их линейные потери энергии, линейная плотность ионизации, интенсивность излучения. Нелинейный отклик биологических систем на изменение физических параметров излучений подтвержден большим количеством экспериментальных данных [36].

Для оценки эффективности воздействия ускоренных электронов при разных мощностях дозы была предложена аппроксимация, описываемая функцией вида $f(D) = e^{a+bD+cD^2+dD^3+o(D)^3}$, где D – поглощенная доза излучения, a – параметр, определяющий положение кривой убывли микроорганизмов относительно осей координат, b , c и d – параметры, отражающие скорость убывания количества жизнеспособных клеток в мясе индейки с увеличением дозы облучения. В табл. 3 представлены значения параметров функции $f(D)$, рассчитанные методом наименьших квадратов. Коэффициенты корреляции составили $R = 0.99$ для 1 и 10 Гр/с, $R = 0.98$ для 100 Гр/с, что говорит об адекватности предложенной аппроксимации.

По результатам метода “отпечатков пальцев” построили графики счетов, на котором по осям отложили главные компоненты (рис. 2). Разным символам отвечают спектры необлученных и облученных образцов, получивших одну и ту же дозу (по другим признакам образцы не отличались). Намечающееся для образцов с добавками флуорофора (рис. 2б) различие между группами облу-

Таблица 3. Параметры аппроксимирующей функции $f(D)$

Мощность дозы, Гр/с	a , отн. ед.	b , Гр ⁻¹	c , Гр ⁻²	d , Гр ⁻³	$R_{\text{корр}}$
1	0.34 ± 0.04	-8.3 ± 1.2	3.5 ± 0.6	-0.41 ± 0.07	0.99
10	0.20 ± 0.02	-7.1 ± 0.7	2.8 ± 0.3	-0.33 ± 0.04	0.99
100	-0.15 ± 0.44	-1.2 ± 1.3	-0.5 ± 0.8	0.05 ± 0.10	0.98

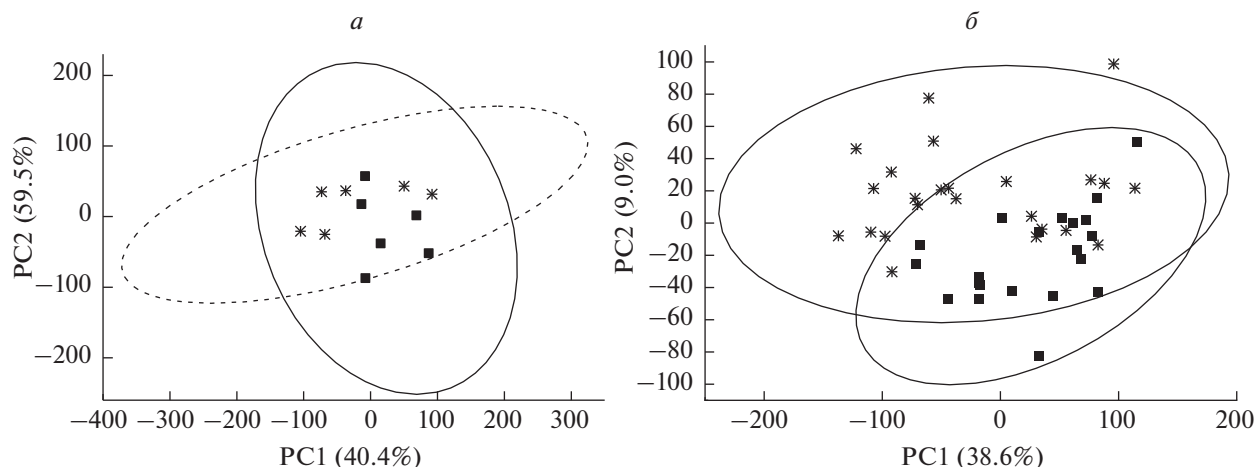


Рис. 2. Графики счетов метода главных компонент для спектров флуоресценции образцов индейки: собственной; по 1 измерению каждого образца (а), в присутствии $Ru(bpy)_3^{2+}$; по 4 параллельных измерения каждого образца (б). Звездочки – образцы, облученные с мощностью дозы 10 Гр/с, квадраты – необлученные. Доверительные эллипсы проведены для 95%-ной доверительной вероятности.

ченных и необлученных образцов недостаточно для их уверенного различия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нелинейность уровня патогенов в продуктах питания от физических параметров наблюдается не только в продуктах мясного, но и рыбного происхождения, что говорит об универсальности полученных результатов [30–32]. В результате проведенных исследований было показано, что радиационная обработка мяса индейки приводит к нелинейному снижению концентрации жизнеспособных микроорганизмов, облученных низкоэнергетическими электронами, в диапазоне от 0.25 до 6 кГр в зависимости от мощности дозы, варьировавшейся изменением тока пучка электронов. Данные результаты были получены впервые и представляют научный и практический интерес.

Флуориметрический метод “отпечатков пальцев” в исследуемом диапазоне параметров не позволил наблюдать значимых различий для облученных и необлученных образцов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ершов Б.Г. // Вестник РАН. 2013. Т. 83. № 10. С. 885.
2. Черняев А.П. Радиационные технологии. Наука. Народное хозяйство. Медицина. М.: Книжный дом “Университет”, 2018. 310 с.
3. European Food Safety Authority // EFSA J. 2011. V. 9. № 4. Art. № 2107.
4. Черняев А.П., Варзарь С.М., Белоусов А.В. и др. // Яд. физ. 2019. Т. 82. № 5. С. 425; Chernyaev A.P., Varzar S.M.,

Belousov A.V. et al. // Phys. Atom. Nucl. 2019. V. 82. № 5. P. 513.

5. Козьмин Г.В., Гераськин С.А., Санжарова Н.И. и др. Радиационные технологии в сельском хозяйстве и пищевой промышленности. Обнинск–Москва: ООО Информполиграф, 2015. 400 с.
6. Devleeschauwer B., Haagsma J.A., Mangen M.J. et al. // Food Safety Econom. 2018. P. 107.
7. https://twosides.info/includes/files/upload/files/UK/Myths_and_Facts_2016_Sources/18-19/Key_facts_on_food_loss_and_waste_you_should_know-FAO_2016.pdf.
8. Ян Ван Козй // Бюллетень МАГАТЭ. 1981. Т. 23. № 3. С. 37.
9. ГОСТ ISO 14470-2014. Радиационная обработка пищевых продуктов. Требования к разработке, валидации и повседневному контролю процесса облучения пищевых продуктов ионизирующим излучением.
10. Lee S.Y., Kim H.W., Hwang K.E. et al. // Korean J. Food Sci. An. 2015. V. 35. № 3. P. 277.
11. Ayari S., Han J., Vu K.D. et al. // Food Control. 2016. V. 64. P. 173.
12. Cheng S., Wang N., Zhang J. et al. // J. Food Process Preserv. 2018. V. 42. Art. № e13448.
13. Li C., He L., Jin G. et al. // Meat Sci. 2017. V. 128. P. 68.
14. Bhoir S.A., Jhaveri M., Chawla S.P. // Food Proc. Engin. 2019. V. 42. Art. № e13254.
15. Barroso A.G., Mastro N.L. // Radiat. Phys. Chem. 2019. V. 158. P. 194.
16. Гребенюк А.Н., Стрелова О.Ю., Легеза В.И., Стенанова Е.Н. Основы радиобиологии и радиационной медицины: Уч. пособ. СПб: ФОЛИАНТ, 2012. 232 с.
17. Nisar M.F., Arshad M.S., Yasin M. et al. // J. Food Proc. Preserv. 2019. V. 43. Art. № e14166.
18. Gaspar E.M., Santana J.S., Santos P.M.P. et al. // J. Sci. Food Agric. 2019. V. 99. P. 1668.

19. *Bercu V., Negut C.D., Dului O.G.* // Radiat. Phys. Chem. 2017. V. 133. P. 45.
20. *Aleksieva K.I., Yordanov N.D.* // Food Res. Int. 2018. V. 105. P. 1019.
21. *Tomaiuolo M., Mangiacotti M., Trotta G. et al.* // Radiat. Phys. Chem. 2018. V. 150. P. 35.
22. *Marcazzo J., Sanchez-Barrera C.E., Urbina-Zavala A., Cruz-Zaragoza E.* // Appl. Radiat. Isot. 2015. V. 104. P. 29.
23. *Song B.S., Kim B.K., Yoon Y.M. et al.* // Food Chem. 2016. V. 200. P. 293.
24. *Cheng S., Wang N., Zhang J. et al.* // J. Food Process Preserv. 2018. V. 42. Art. № e13448.
25. *Li C., He L., Jin G. et al.* // Meat Sci. 2017. V. 128. P. 68.
26. *Rukosueva E.A., Dobrolyubov E.O., Goryacheva I.Yu., Beklemishev M.K.* // Microchem. J. 2019. V. 145. P. 397.
27. *Divyanin N.N., Razina A.V., Rukosueva E.A. et al.* // Microchem. J. 2017. V. 135. P. 48.
28. *Kostereli Z., Scopelliti R., Severin K.* // Chem. Sci. 2014. V. 5. P. 2456.
29. *Han J., Cheng H., Wang B. et al.* // Angew. Chem. Int. Ed. 2017. V. 56. Art. № 15246.
30. *Bliznyuk U.A., Borchegovskaya P.Y., Chernyaev A.P. et al.* // IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci. 2019. V. 365. Art. № 012002.
31. *Черняев А.П., Авдюхина В.М., Близнюк У.А. и др.* // Изв. РАН. Сер. физ. 2020. Т. 84. № 4. С. 501; *Chernyaev A.P., Avdukhina V.M., Bliznyuk U.A. et al.* // Bull. Russ. Acad. Sci. Phys. 2020. V. 84. № 4. P. 385.
32. *Близнюк У.А., Авдюхина В.М., Борщеговская П.Ю. и др.* // Изв. РАН. Сер. физ. 2018. Т. 82. № 6. С. 824; *Bliznyuk U.A., Avdyukhina V.M., Borchegovskaya P.U. et al.* // Bull. Russ. Acad. Sci. Phys. 2018. V. 82. № 6. P. 740.
33. International organization for standardization, American society for testing and materials, Practice for use of a radiochromic film dosimetry system, ISO/ASTM 51275:2013, ISO, Geneva. 2013.
34. *Esbensen K.H.* Multivariate data analysis – in practice. An introduction to multivariate data analysis and experimental design, Oslo: CAMO AS, 2001.
35. *Каламбет Ю.А., Козьми Ю.П., Самохин А.С.* // Аналитика. 2017. Т. 36. № 5. С. 88.
36. *Кудряшов Ю.Б., Беренфельд Б.С.* Основы радиационной биофизики: Учебник. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1982. 304 с.