

пах была выше на 5,9-12,7%, в том числе от первого осеменения – на 10,3-16,8,0%. Наилучшие результаты получены в IV опытной группе при комплексном использовании моциона и подкормки биологически активным препаратом Баксин-вет.

Выводы.

Установлено, что как предоставление коровам выгульного содержания, так и подкормка препаратом Баксин-вет способствуют улучшению всех показателей воспроизводства у глубокостельных коров. Однако наибольший эффект получен при комплексном применении данных технологических приемов.

В IV опытной группе коров сохранность приплода в 2-х месячном возрасте была 100,0%-й, а оплодотворяемость от первого осеменения после отела превышала контроль на 16,8%.

Таким образом, для повышения воспроизводительной функции коров рекомендуем выгульное их содержание с подкормкой препаратом Баксин-вет за 30 дней до отела и 30 дней после отела в дозе 15 мг/кг живой массы.

Библиографический список

1. Шарапа Г.С. Оценка воспроизводительной способности высокопродуктивных коров/ Г.С.Шарапа// Новое в методах зоотехнических исследований. – Ж.: - 1992. – С.118-123.
2. Токарев М.Ф. Интенсивное воспроизводство молочного стада /М.Ф.Токарев// Животноводство Украины. – 1998. - №4. – С.15.
3. Польовий Л.В., Столяр Ж.В., Данчевский О.В. Вплив різних видів моціону на відтворні та продуктивні ознаки корів української чорно-рябої молочної породи// Науковий вісник національного університету біоресурсів і природокористування України. - №160, ч.1., - 2011. – С.97-101.
4. Баксин-вет. Возможности применения в птицеводстве и животноводстве. – Москва. – 2009. -12с.
5. Околышев С.М. Применение препарата Баксин-вет для повышения репродуктивных показателей в промышленном свиноводстве /С.М.Околышев, И.И. Гришков, Р.А. Корнилин// Промышленное и племенное свиноводство, №6, - 2008.- С.25-26.
6. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных. Справочное пособие, Москва, - 2003. – С.36-42.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОРМАЛЬДЕГИДА В РЫБЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АЛКОГОЛЬОКСИДАЗЫ И ФОРМАЛЬДЕГИДДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Сибирный Владимир Андреевич, кандидат биологических наук, научный сотрудник УГСХА, e-mail: vladimir_sibirnyi@yahoo.com

Гончар Михаил Васильевич, доктор биологических наук, профессор, Институт биологии клетки НАН Украины, e-mail: myg52@yahoo.com

Ключевые слова: формальдегид, алкогольоксидаза, формальдегиддегидрогеназа, рыбные продукты.

В статье описаны два ферментативных метода анализа формальдегида в рыбных продуктах с использованием алкогольоксидазы и формальдегиддегидрогеназы, выделенных из сконструированных нами ранее мутантного и рекомбинантного штаммов метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha*. Показана возможность успешного применения обоих методов для анализа формальдегида в рыбных продуктах. Аналитические параметры ферментативных методов сравнены с соответствующими параметрами нескольких химических методов.

Введение

Формальдегид (ФА) производится промышленностью в огромных количествах и вместе с тем является важнейшим метаболитом живых организмов [1]. Высокая токсичность ФА вызывает необходимость его контроля в окружающей среде и в продуктах питания. Особенно высок уровень ФА в некоторых рыбных продуктах. В тканях мороженой морской рыбы семейства тресковых (*Gadidae*) – трески (*Gadus morhua*), сайды (*G. virens*), пикши (*G. aeglefinus*), мерлана (*G. merlangus*), хека (*Merluccius sp.*) при неглубокой заморозке содержание ФА может достигать 780 мг на 1 кг массы, что приводит к ухудшению вкусовых качеств и даже к отравлению [2].

Формальдегид (ФА) наряду с диметиламином (ДМА) являются продуктами одной и той же реакции ферментативного разложения природного компонента рыбы – триметиламинооксида (ТМАО), играющего важную роль в регуляции осмотического давления в клетках [3]. Другой продукт реакции деметилирования ТМАО – диметиламин является канцерогеном, так как при наличии в пище нитратов под воздействием бактериальных ферментов в желудочно-кишечном тракте он превращается в нитрозодиметиламин, метаболизм которого приводит к образованию ФА, что может быть одним из дополнительных факторов канцерогенеза [4].

Для определения ФА используются химические и физико-химические методы, хотя они не лишены серьезных недостатков. Последние достижения в области анализа ФА включают ферментативный и биосенсорный методы, основанные на использовании рекомбинантной формальдегиддегидрогеназы и алкогольоксидазы из метилотрофных дрожжей [5, 6].

Материалы и методы

Использовали следующие реактивы: нитротетразолиевый голубой (НТВ) фирмы «Merck» (Германия); параформальдегид, Тритон X-100, хромотроповая кислота, 3-метил-2-бензотиазолинон гидразон гидрохлорид (МБТГ) фирмы «Sigma-Aldrich»; 3-(N-морфолино)-пропансульфоновая кислота (MOPS), глутатион, феназин метосуль-

фат (PMS), тетраметилбензидин гидрохлорид (ТМВ), 4-амино-3-гидразин-5-меркапто-1,2,4-триазол фирмы «Fluka» (Швейцария); НАД⁺ и НАДН получены от «Gerbu Biotechnik» (Германия). Все другие реактивы квалификации ч.д.а.

Ферменты и ферментные наборы. Пероксидаза (ПО) хрена фирмы «Астер» (Украина). Алкогольоксидаза (АО) выделена и очищена из клеток безкаталазного мутанта *Hansenula polymorpha* C-105 (*gcr1 catX*) [7]. Формальдегиддегидрогеназу (ФдДГ) получали из клеток сконструированного нами рекомбинантного штамма *H. polymorpha* Tf 11-6 [6]. В качестве источника АО, ПО и хромогена использовали также ферментный набор «Алкотест».

Для определения ФА в мясе рыбы (мышечная ткань замороженных хека, трески или свежего карпа) применяли две различные методики депротенинизации образцов. *Методика 1.* 2,5 г мышечной ткани растирали в керамической ступке. После добавления 10 мл воды смесь растирали, смешивая с 2 мл реагента Карре-1, 2 мл реагента Карре-2 и 34 мл воды, после чего фильтровали. Фильтраты до проведения анализа хранили при +4 °С. *Методика 2.* 5 г мышечной ткани растирали в керамической ступке, после добавления 10 мл воды растирали, добавляли 2,5 мл 40%-ной ТХУ, перемешивали, затем доводили общий объем до 25 мл водой. Осажденные белки удаляли фильтрацией, фильтраты нейтрализовали раствором КОН до pH 7,0 и хранили при +4 °С до проведения анализа.

I. Химическое определение ФА проводили по методике Нэша, а также методами с использованием хромотроповой кислоты, 4-амино-3-гидразино-5-меркапто-1,2,4-триазола («Пурпальд») и 3-метил-2-бензотиазолин гидразон гидрохлорида (МБТГ) [5, 9].

II. Ферментативное определение ФА

Анализ ФА с использованием АО (АОП-метод) проводили при помощи ферментативного набора «Алкотест» [8]. 0,2 мл анализируемого экстракта доводили водой до объема 0,5 мл и добавляли 3 мл свежеприготовленного реактива. Образцы инкубиро-

вали 25 мин. Реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 0,8 М HCl к каждой пробе, измеряли оптическую плотность при 450 нм против контроля, содержащего воду. Калибровочную кривую (рис. 1) строили на основе данных фотометрии образцов с различным количеством ФА (50 – 500 мкл 0,2 мМ CH₂O добавляли до реакционной смеси с интервалом 50 мкл). Расчет содержания ФА (в мг на 1 кг влажной массы образца) проводили с использованием формулы:

$C_{\text{мг/кг}} = 600 \times 0,2 A_e / A_c = 120 \times A_e / A_c$, где A_e и A_c – значения оптической плотности экспериментальных калибровочных растворов, соответственно; 0,2 – миллимолярная (мМ или мкмоли/мл) концентрация ФА в калибровочном растворе; 600 – коэффициент.

Ферментативное определение ФА с использованием ФдДГ

Разработанный метод основан на фотометрическом определении формаза, который образуется из NTV в реакции, связанной с окислением ФА, катализируемого ФдДГ [6]. К 0,5 мл испытуемого образца и калибровочного раствора (вода в случае контроля) добавляли 0,5 мл ФдДГ-содержащий реагент следующего состава: 0,023 Ед./мл ФдДГ, 0,63 мМ восстановленного глутатиона, 0,31 мМ НАД⁺, 1,0 мМ NTV, 0,024 мМ PMS и 0,01% Тритон X-100 в 60 мМ K,Na-фосфатном буфере рН 8,0). Реакционную смесь инкубировали 30 мин. Для остановки реакции добавляли 3 мл 0,3 М HCl и определяли оптическую плотность при 570 нм. Содержание ФА рассчитывали: а) по калибровочной кривой для традиционного варианта анализа (калибровка не зависит от испытуемых образцов); б) с использованием метода стандартных добавок (аликвоту калибровочного раствора добавляли к анализируемому образцу). В этом случае расчеты выполняли с учетом двух параметров: результат для исследуемого образца без добавленного калибровочного раствора и наклона для калибровочной кривой, полученной на фоне исследуемого образца.

Результаты исследований и их обсуждение

Недавно были описаны ферментативные методы определения ФА на основе ис-

пользования рекомбинантной ФдДГ [6], которая в присутствии восстановленного глутатиона и кофермента (НАД⁺) окисляет ФА до муравьиной кислоты. Образующий в реакции НАДН восстанавливает соль тетразолия (при наличии медиатора ПМС) до цветного формаза, который может быть измерен фотометрически в растворимой форме в присутствии детергента Тритон X-100.

Использование АО для анализа ФА основано на том, что ФА в водных растворах пребывает в гидратной форме, имеющей структурное сходство с метанолом, и может окисляться АО с образованием муравьиной кислоты и перекиси водорода.

Мы показали ранее применение АО для ферментативного анализа ФА в сточных водах даже в присутствии метанола [9]. Целью данного исследования была оценка возможности использования обоих ферментов, АО (с пероксидазой) и ФдДГ для анализа ФА в рыбных продуктах. Полученные результаты сравнивали с данными четырех химических методов.

На рис. 1 представлены калибровочные кривые для двух ферментативных методов по сравнению с химическими методами. Как можно видеть, АОП-метод имеет наивысшую чувствительность: наклон калибровочной кривой равен 59,3, что соответствует миллимолярной экстинкции образованного окрашенного продукта (в мМ⁻¹ см⁻¹). Действительно, наблюдаемое значение наклона – это миллимолярная экстинкция исчезновения ($\epsilon_{\text{мм}}$), умноженная на коэффициент преобразования для ферментативной реакции (κ): наклон = $\epsilon_{\text{мм}} \times \kappa$. Величина $\epsilon_{\text{мм}}$ для окисленного ТМБ равна 81,7 мМ⁻¹ см⁻¹ [10], таким образом, коэффициент преобразования аналита для АОП-метода составляет 72,6 %. Для ФдДГ-метода, коэффициент преобразования аналита составляет 32,9 %, предполагаемая миллимолярная экстинкция для НБТ-формаза равна 10,2 мМ⁻¹ см⁻¹ при 570 нм в кислой среде.

Линейность калибровочной кривой для АОП-метода сохранялась даже при оптической плотности до 0,9, что соответствует 15 мкМ ФА в реакционной смеси; порог чувствительности метода составлял около 0,8

нмоль/мл. Эти аналитические параметры наилучшие по сравнению с химическими методами.

Метод на основе ФдДГ показывает линейность до 100 мкМ ФА и чувствительность, близкую к методу Нэша (наклоны 3,36 и 4,46, соответственно). По сравнению с АОП-методом, метод с использованием ФдДГ почти в 18 раз менее чувствителен. Аналитические параметры предлагаемых ферментативных методов по сравнению с химическими методиками представлены в табл. 1.

На основании анализа данных можно сделать вывод о том, что АОП-метод и метод с использованием МБТГ имеют наилучшие характеристики. Что касается селективности, то МБТГ не является специфичным: широкий ряд альдегидов дают положительную реакцию с МБТГ [9]. АО среди альдегидов может катализировать окисление только ФА, хотя и распознает первичные спирты, в первую очередь, метанол и этанол. Принимая во внимание отсутствие спиртов в тканях рыб, можно прийти к заключению, что лучше всего для определения ФА в рыбных продуктах подходит АОП-метод по сравнению с использованием МБТГ.

Чтобы проверить обоснованность предлагаемых ферментативных методов, мы проанализировали мышечную ткань образцов замороженного хека и трески. Для депротеинизации проб использовали реагенты Каррец, однако было показано, что это полностью нарушает течение реакции, катализируемой ФдДГ. Поэтому для определения ФА с помощью ФдДГ пробы должны депротеинизоваться воздействием ТХУ с последующей нейтрализацией.

Полученные результаты представлены в табл. 1 и 2. Выявлено, что образцы хека и трески содержат высокие концентрации ФА, до 100 мг/кг влажной массы ткани. Содержа-

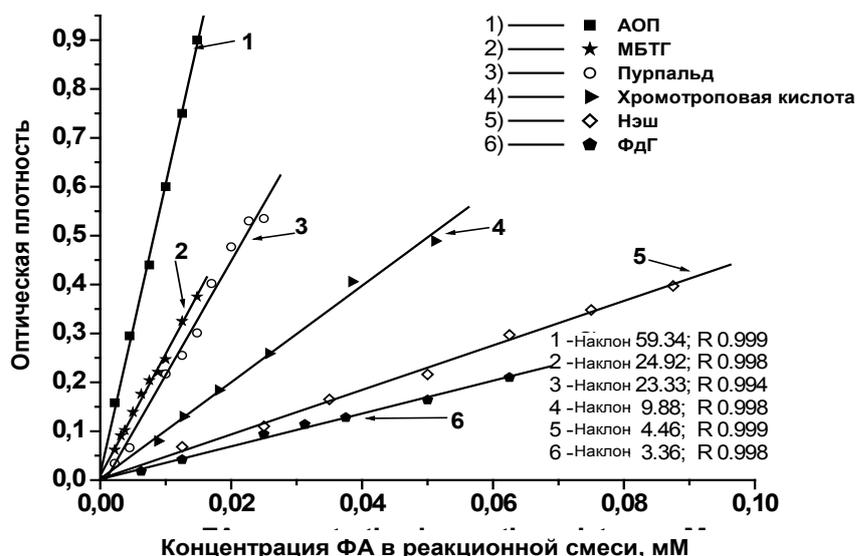


Рис. 1 - Сравнительный анализ различных методов анализа ФА: АО-пероксидазный (АОП), метод с использованием «Пурпальда», метод Нэша, метод с использованием МБТГ (гидрохлорид 3-метил-2-бензотиазолин гидразона), метод с использованием хромотроповой кислоты и формальдегиддегидрогеназный метод (ФдДГ). Наклон калибровочных кривых характеризует чувствительность методов.

ание ФА в мышцах карпа ничтожно мало. Данные табл. 2, показывают существенное различие содержания ФА при его определении различными методами. Для сравнения надежности действия обоих ферментативных методов и оценки интерферирующего влияния химического фона реальных образцов мы проанализировали содержание ФА в ТХУ-экстрактах с помощью традиционной методики (с внешней калибровкой), а также с использованием метода стандартных добавок (МСД). Одновременно содержание ФА было определено двумя химическими методами (с использованием хромотроповой кислоты и МБТГ). Как видно из данных табл. 2, существует хорошая корреляция между всеми аналитическими данными, полученными в МСД-варианте методики, в отличие от результатов, полученных в традиционном варианте с внешней калибровкой. Это явление можно объяснить интерферирующим влиянием некоторых компонентов, которые совместно экстрагировались ТХУ из тканей рыб, что четко подтверждается данными, полученными методом на основе ФдДГ (рис. 2). Наклон калибровочных

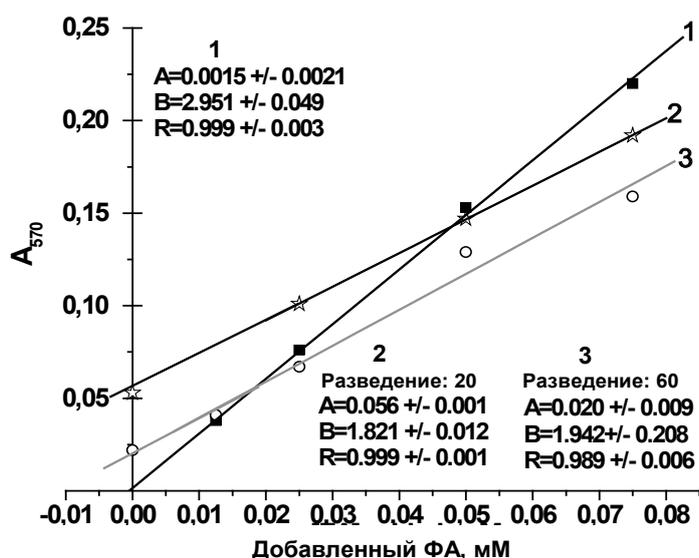


Рис. 2 - Метод стандартных добавок для определения ФА с использованием ФдДГ- метода. Кривая 1 соответствует калибровочному методу, проведенному для водных растворов ФА (внешняя обычная калибровка); кривые 2 и 3 соответствуют методу стандартных добавок (ФА добавляли в различных концентрациях к растворам анализируемых проб). На рисунке представлены некоторые статистические данные: параметры линейной регрессии (коэффициенты уравнения $Y=A+BX$, где Y – оптическая плотность, X – концентрация ФА (мм), A – оптическая плотность для проб без добавления экзогенного ФА, и B – значение наклона); R – коэффициент линейной регрессии.

кривых, выполненных при анализе экстрактов из ткани рыбы, зависит от фактора разведения: чем больше разведение, тем сильнее наклон (меньше интерферирующее влияние). Для внешней калибровки (без наличия фона реального образца, что соответствует бесконечному разбавлению), наклон был наибольшим: 2,95 по сравнению с 1,94 (60-кратное разведение) и 1,82 (20-кратное разведение). Для АОП-метода, как и для химических вариантов, не выявлена существенная разница между традиционным и МСД-вариантом анализа.

Заключение

В настоящей работе представлены результаты применения двух разработанных ферментативных методов для анализа ФА в рыбе с использованием сконструированных нами ранее продуцентов ферментов. Оба фермента изолированы из дрожжевых клеток *Hansenula polymorpha*: мутанта С-105 со сверхпродукцией АО [5] и рекомбинантного штамма Т-11-6 гиперэкспрессией гена *FLD1*, кодирующего ФдДГ [6].

Рыба семейства Тресковых (*Gadidae*) занимает второе место по размеру промышленного улова после

Таблица 1

Биоаналитические характеристики различных методов анализа формальдегида

Метод	λ_{\max} , нм	ϵ , $\text{мм}^{-1} \text{см}^{-1}$	Лимит определения, мкМ	Диапазон линейности, мм	Стабильность цвета, ч	Время анализа, мин	
Химический	МВТН	670	65,0	0,9	0,0025-0,015	>40	30
	Хромотроповая кислота	578	15,7	2,5	0,005-0,05	>24	30
	Пурпальд	548	28,2	1,5	до 0,025	-	20
	Метод Нэша	400	4,4	6,9	до 0,110	>5	5
Ферментативный	На основе ФдДГ	570	10,2 (3,36 при неполной конверсии)	8,9	0,01-0,06	>8	15
	ФдДГ и Диафораза	500	11,0	1,7	до 0.1	-	21
	На основе АОП	450	59,3	0,80	0,001-0,015	>5	20

семейства Сельдевых рыб (*Clupeidae*). В тканях тресковых рыб накапливаются высокие концентрации токсичного ФА, что приводит к снижению качества пищевых продуктов и вредно для здоровья потребителей [2]. Это важный аргумент в пользу необходимости разработки селективных, чувствительных и хорошо воспроизводимых методов контроля содержания опасного метаболита. Было установлено, что АОП-метод, обладающий высокой чувствительностью, может применяться без использования метода стандартных добавок (МСД) для калибровки.

Кроме того, установлено, что метод на основе использования фермента ФдДГ требует МСД-калибровки, причем этот метод менее чувствителен. Выявлена хорошая корреляция результатов анализа для обоих ферментативных методов по сравнению с химическими методиками, хотя анализ на основе АО является предпочтительным из-за его высокой чувствительности, хорошей линейности, нечувствительности к интерферирующему влиянию компонентов проб, использования без предварительной обработки образцов и отсутствия агрессивных реагентов.

Установлено, что тресковые рыбы (хек, треска) действительно содержат высокие концентрации токсичного ФА, до 100 мг/кг мышечной ткани. Как и можно было предполагать, содержание ФА в тканях свежего карпа незначительно. АОП метод может быть использован для определения ФА в замороженной рыбе семьи тресковых - треска, хек, и др. Полученные результаты свидетельствуют о высоком содержании этого токсичного вещества, что указывает на необходимость постоянного мониторинга

Таблица 2

Результаты определения ФА (в мг на 1 кг влажной мышечной ткани) в безбелковых экстрактах рыбы с использованием трех различных методов: на основе АО, метода Нэша и реактива «Пурпальд».

Рыба \ Метод	Хек	Треска	Карп
На основе АО M±m	90,0±2,6	74,1±1,1	0
Нэш M±m	121,6±0.9	96,8±3,1	0
«Пурпальд» M±m	100,6±1.6	59,7±3,1	0

Таблица 3

Результаты определения ФА (в мг на 1 кг влажной массы мышечной ткани) в безбелковых экстрактах рыбы хек при использовании четырех различных методов.

Метод	Метод стандартных добавок (МСД)	Стандартная методика
На основе ФдДГ M±m	101,8±3,2 (p<0,05)*	64,3±8,6
На основе АО M±m	95,3±3,7 (p>0,05)**	98,0±3,5
МБТГ M±m	104,3±5,6 (p>0,05)**	106,4±7,9
Хромотроповая кислота M±m	100,5±1,2 (p>0,05)**	102,8±7,3

*Разница между стандартной методикой и МСД статистически достоверна;

**Разница между стандартной методикой и МСД статистически недостоверна.

формальдегида при оценке качества пищевых продуктов.

Библиографический список

1. Flyvholm M.A., Andersen P. Identification of formaldehyde releasers and occurrence of formaldehyde and formaldehyde releasers in registered chemical products // Am. J. Ind. Med. – 1993. – V. 24. – P. 533-552.
2. Rehbein H. Formaldehyd und Dimethylamin in tiefgekuhlten Fischerzeugnissen aus dem Handel - eine Bestandsaufnahme // Archiv Lebensmittelhyg. - 1995. – V. 46. – P. 122-124.
3. Tseng H.C., Graves D.J. Natural methyamine osmolytes, trimethylamine N-oxide

and betaine, increase tau-induced polymerization of microtubules // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1998. – V. 250. – P. 726-730.

4. Belinsky S.A. Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer // Nature Reviews Cancer. - 2004. - V. 4. - P. 707–717.

5. Сибирный В.А., Гончар М.В., Рябова О.В., Майдан М.М. Современные методы анализа формальдегида, метанола и этанола с использованием микробных и ферментных систем // Микробиол. ж. (Киев). - 2005. - Т. 67. - С. 85-110.

6. Demkiv O.M., Paryzhak S.Y., Gayda G.Z., Sibirny V.A., Gonchar M.V. Formaldehyde dehydrogenase from recombinant yeast *Hansenula polymorpha*: isolation and bioanalytical application // FEMS Yeast Res. – 2007. – V. 7. – P. 1153-1159.

7. Gonchar M., Mайдан M., Pavlishko H., Sibirny A. A new oxidase-peroxidase kit for ethanol assays in alcoholic beverages // Food Technol. Biotechnol. – 2001. – V. 39. – P. 37-42.

8. Gonchar M., Strzelczyk M., Mайдан M., Bien J. Sibirny A. Zastosowanie metody enzymatycznej do analizy formaldehydu w roztworach wodnych // Ochrona Srodowiska. – 1998. – № 3(70). – P. 35-38.

9. Sibirny V.A., Gonchar M.V., Grabek-Lejko D., Csoregi E., Pavlishko H.M., Sibirny A.A. Photometric assay of methanol and formaldehyde in industrial waste-waters using alcohol oxidase and 3-methyl-2-benzothiazoline hydrazone // Int. J. Environ. Analytic. Chem. – 2008. – V. 88. – P. 1-13.

10. Brehe J., Burch H.B. Enzymatic assay of glutathione // Anal Biochem. - 1976. - V. 74. - P. 189–197.