

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра
здравоохранения – Главный
государственный санитарный врач
Республики Беларусь



И.В. Гаевский

2016 г.

Регистрационный номер № 035-1215

**ЭКСПРЕСС-МЕТОДЫ ОЦЕНКИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ
ЦЕННОСТИ И БЕЗВРЕДНОСТИ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ
НА TETRAHYMENA PYRIFORMIS**

Инструкция по применению

Учреждение-разработчик: Республиканское унитарное предприятие
«Научно-практический центр гигиены».

Авторы: к.м.н., Бондарук А.М., к.м.н., доцент Цыганков В.Г.,
к.б.н., Журихина Л.Н., Свинтилова Т.Н., Осипова Т.С., Долгина Н.А.

Минск, 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра –
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ И.В. Гаевский
21.03.2016
Регистрационный № 035-1215

**ЭКСПРЕСС-МЕТОДЫ ОЦЕНКИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЦЕННОСТИ
И БЕЗВРЕДНОСТИ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ
НА *TETRAHYMENA PYRIFORMIS***

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: РУП «Научно-практический центр гигиены»

АВТОРЫ: канд. мед. наук А.М. Бондарук, канд. мед. наук, доц. В.Г. Цыганков,
канд. биол. наук Л.Н. Журихина, Т.Н. Свинтилова, Т.С. Осипова, Н.А. Долгина

Минск 2015

ГЛАВА 1 НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) приведены экспресс-методы оценки биологической ценности и безвредности пищевой продукции растительного и животного происхождения, рыбы, морепродуктов, специализированной пищевой продукции для детского питания на тест-объекте, лабораторной популяции одноклеточных простейших — инфузорий *Tetrahymena pyriformis* (TP) штамм W.

2. Настоящая инструкция по применению предназначена для органов и учреждений, проводящих государственный санитарный надзор, иных организаций, выполняющих исследования с целью первичной биологической оценки продовольственного сырья и пищевых продуктов, а также для дальнейшего текущего контроля разработки, рационализации и правильного осуществления технологий их производства и хранения. Применение инструкции позволит получить данные о биологической ценности и безвредности продовольственного сырья и пищевых продуктов, подвергнутых тому или иному технологическому воздействию.

ГЛАВА 2 ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКИ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ НА *TETRAHYMENA PYRIFORMIS*

1. В ходе экспериментальных исследований в науке о питании сложилось представление, что изучение химического состава пищевой продукции не может быть объективным показателем ее биологической ценности и безвредности. Только при взаимодействии двух систем: пищевой продукт — организм можно составить объективное суждение о безвредности того или иного пищевого продукта.

При оценке качества пищевого продукта такие параметры, как калорийность, содержание пищевых, минеральных веществ, витаминов далеко не достаточны. Необходимо разрабатывать биотестовые методы, направленные на оценку биологической ценности и безвредности пищевых продуктов. Предпосылкой для целостных, биологических методов является утверждение, что «живое целое — это больше, чем сумма его частей».

Согласно традиционным методам биологической оценки продуктов на *Tetrahymena pyriformis* рассчитывается относительная биологическая ценность опытного продукта по отношению к контрольному или к стандарту, при этом пробы продуктов должны быть идентичными по содержанию белка (Н.Г. Беленький, 1977).

Анализ отечественных и зарубежных источников, а также результатов наших предыдущих исследований по медико-биологической оценке пищевой продукции, выработанной по различным технологиям, показал, что биотестирование пищевой продукции на *Tetrahymena pyriformis* требует индивидуализации методических подходов к оценке безвредности

и биологической ценности продукции разных групп. Важными методическими моментами при проведении испытаний являются: выбор концентраций исследуемого продукта, состава среды культивирования *Tetrahymena pyriformis* на его основе и состава стандарта сравнения.

При разработке методических подходов к оценке пищевой продукции на *Tetrahymena pyriformis* мы руководствовались необходимостью экстраполяции полученных результатов на человека. Поэтому учитывалась суточная потребность человека в пищевых и биологически активных веществах.

1.1. Анализ химического состава пищевых продуктов.

По результатам анализа все пищевые продукты, имеющие схожий нутриентный состав и энергетическую ценность, объединены в отдельные группы: мясные, молочные, жиры, зерно и продукты его переработки, плодоовощная продукция и отдельно картофель. Его нельзя отнести к зерновым из-за низкого содержания белка. В то же время картофель нельзя отнести к группе овощей из-за относительно высокого содержания крахмала.

По выделенным группам проанализированы суточные рационы энергетической ценностью от 2000 до 8000 ккал. Для каждой группы продуктов в составе рационов рассчитана усредненная величина «ккал/г», названная «условной энергетической плотностью (УЭП)» (таблица 1).

Таблица 1. — Основные группы продуктов в составе рационов, сбалансированных по макро- и микронутриентам

Группы продуктов	Доля от массы рациона, %	Доля от энергии рациона, %	УЭП, ккал/г	Белки, г/г	Жиры, г/г	Углеводы, г/г
Мясо, рыба, морепродукты	8,0	10,0	1,41	0,17	0,08	0,00
Молочные	18,0	11,0	0,68	0,04	0,03	0,04
Жиры	1,2	9,0	8,34	0,00	0,92	0,00
Продукты переработки зерна	8,0	17,0	2,29	0,09	0,02	0,43
Картофель	14,0	10,0	0,80	0,02	0,00	0,16
Овощи, зелень	14,0	3,0	0,24	0,02	0,00	0,04
Фрукты, ягоды, соки	27,0	12,0	0,47	0,005	0,00	0,10
Сахар, мед, кондитерские изделия	10,0	28,0	3,21	0,005	0,00	0,94

С использованием величин условной энергетической плотности и суточной потребности в энергии рассчитано содержание продуктов (г) в рационах разной энергетической ценности, а также их эквивалентное содержание (мг/мл) в среде культивирования *Tetrahymena pyriformis*. Мы применили выведенный нами ранее коэффициент экстраполяции (20000) данных, полученных в экспериментах на *Tetrahymena pyriformis* и теплокровных животных (таблицы 2, 3).

Таблица 2. — Содержание основных групп пищевых продуктов в рационах человека (г) и среде культивирования *Tetrahymena pyriformis* (мг/мл)

Группы продуктов	Доля от энергии рациона, %	Ккал/г	2000 ккал			4000 ккал		
			ккал	г	мг/мл	ккал	г	мг/мл
Мясо, море- и рыбопродукты	10,0	1,41	200	142	7,1	400	284	14,2
Молочные продукты	11,0	0,68	220	323	16,2	440	647	32,4
Жиры	9,0	8,34	180	22	1,1	360	43	2,2
Зерновые продукты	17,0	2,29	340	148	7,4	680	297	14,8
Картофель	10,0	0,80	200	250	12,5	400	500	25
Овощи и зелень	3,0	0,24	60	250	12,5	120	500	25
Фрукты, ягоды, соки	12,0	0,47	240	511	25,6	480	1021	51
Сахар, мед, кондитерские изделия	28,0	3,21	560	174	8,7	1120	349	17,4

Таблица 3. — Содержание основных групп пищевых продуктов в рационах человека (г) и среде культивирования *Tetrahymena pyriformis* (мг/мл)

Группы продуктов	Доля от энергии рациона, %	Ккал/г	6000 ккал			8000 ккал		
			ккал	г	мг/мл	ккал	г	мг/мл
Мясо, море- и рыбопродукты	10,0	1,41	600	425	21,2	800	567	28,4
Молочные продукты	11,0	0,68	660	970	48,5	880	1294	64,7
Жиры	9,0	8,34	540	65	3,25	720	86	4,3
Зерновые продукты	17,0	2,29	1020	445	22,2	1360	594	29,7
Картофель	10,0	0,80	600	750	37,5	800	1000	50
Овощи и зелень	3,0	0,24	180	750	37,5	240	1000	50
Фрукты, ягоды, соки	12,0	0,47	720	1532	76,6	960	2042	102
Сахар, мед, кондитерские изделия	28,0	3,21	1680	523	26,2	2240	698	34,9

1.2. Приготовление и расчет содержания витаминов и минеральных веществ в среде культивирования *Tetrahymena pyriformis* для оценки биологической ценности пищевой продукции

С использованием коэффициента экстраполяции рассчитано содержание минеральных элементов (МЭ) и витаминов в 1 мл среды культивирования *Tetrahymena pyriformis*, соответствующее адекватному уровню суточного потребления основных пищевых веществ в составе рациона человека энергетической ценностью 2300 ккал согласно Единым санитарно-эпидемиологическим и гигиеническим требованиям к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю), утвержденным

Решением комиссии Таможенного союза (ТС) от 28.05.2010 № 299 (таблицы 4, 5).

Таблица 4. — Содержание витаминов в среде культивирования *TP*

Витамины и витаминоподобные вещества	Суточная доза для человека согласно Единым санитарным требованиям ТС	Содержание в 1 мл среды культивирования <i>Tetrahymena pyriformis</i>
В ₁ (тиамин)	1,5 мг	0,0001 мг/мл
В ₂ (рибофлавин)	1,8 мг	0,0001 мг/мл
В ₃ (РР, ниацин)	20 мг	0,0010 мг/мл
В ₄ (холин хлорид)	0,5 г	0,0250 мг/мл
В ₅ (пантотенат)	5 мг	0,0003 мг/мл
В ₆ (пиридоксин)	2 мг	0,0001 мг/мл
В ₉ (В _с , фолацин)	400 мкг	0,0200 мкг/мл
В ₁₂ (кобаламин)	3 мкг	0,0002 мкг/мл
В _н (биотин)	50 мкг	0,0025 мкг/мл
В ₈ (инозит)	500 мг	0,0250 мг/мл
ПАБК (парааминобензойная кислота)	100 мг	0,0050 мг/мл
С (аскорбиновая кислота)	90 мг	0,0045 мг/мл
А (ретинол)	0,9 мг РЭ	0,0450 мкг/мл
Е (токоферолы)	15 мг ТЭ	0,0008 мг/мл
Д (кальциферол)	10 мкг (400 ме)	0,0005 мкг/мл
К (филлохиноны)	120 мкг	0,0060 мкг/мл

Таблица 5. — Содержание минеральных элементов в среде культивирования *Tetrahymena pyriformis*

Элемент	Суточная доза для человека согласно Единым санитарным требованиям ТС	Содержание в 1 мл среды культивирования <i>Tetrahymena pyriformis</i>
Кальций-ион	1000 мг	0,0500 мг/мл
Магний-ион	400 мг	0,0200 мг/мл
Фосфор-ион	800 мг	0,0400 мг/мл
Калий-ион	2500 мг	0,1250 мг/мл
Натрий-ион	1300 мг	0,0650 мг/мл
Железо-ион	18 мг	0,0009 мг/мл
Цинк-ион	12 мг	0,0006 мг/мл
Йод-ион	150 мкг	0,0075 мкг/мл
Селен-ион	75 мкг	0,0038 мкг/мл
Медь-ион	1 мг	0,0500 мкг/мл
Молибден-ион	70 мкг	0,0035 мкг/мл
Хром-ион	50 мкг	0,0025 мкг/мл
Марганец-ион	2 мг	0,1000 мкг/мл
Кремний-ион	30 мг	0,0015 мг/мл
Кобальт-ион	10 мкг	0,0005 мкг/мл
Фтор-ион	4 мг	0,2000 мкг/мл
Ванадий-ион	15 мкг	0,0008 мкг/мл
Бор-ион	2 мг	0,1000 мкг/мл
Серебро-ион	30 мкг	0,0015 мкг/мл
Алюминий-ион	20 мг	0,0010 мг/мл

Исходя из содержания элемента в минеральной соли, рассчитаны навески солей для внесения в 1 л среды культивирования *Tetrahymena pyriformis*, необходимые для обеспечения адекватного уровня содержания элемента в 1 мл среды (таблица 6).

Таблица 6. — Расчет навесок минеральных солей, соответствующих адекватному уровню потребления элемента, для внесения в 1 л среды культивирования *Tetrahymena pyriformis*

Элемент	Содержание в СК		Формула соли	Навеска для внесения в 1 л СК
	в 1 мл	в 1000 мл		
Ca	0,0500 мг	50 мг	CaCO ₃	0,1249 г
Mg	0,0200 мг	20 мг	MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2027 г
P	0,0400 мг	40 мг	KH ₂ PO ₄	0,1756 г
K	0,1250 мг	73 мг	K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	0,2130 г
		50,5 мг	KH ₂ PO ₄	см. фосфор
Na	0,0650 мг	65 мг	NaCl	0,1652
Fe	0,0009 мг	0,9 мг	FeSO ₄ 7H ₂ O	0,0045
Zn	0,0006 мг	0,6 мг	ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,0026
I	0,0075 мкг	7,5 мкг	KI	0,0098 мг
Cu	0,0500 мкг	50 мкг	CuSO ₄ 5H ₂ O	0,1964 мг
Mn	0,1000 мкг	100 мкг	MnSO ₄ H ₂ O	0,3076 мг
Co	0,0005 мкг	0,5 мкг	CoCl ₂ 6H ₂ O	0,0020 мг
F	0,2000 мкг	0,2000 мг	NaF	0,5262 мг
Al	0,0010 мг	1 мг	KAl(SO ₄) ₂ 12 H ₂ O	0,0176 (1,4 мг K)

Приготовление растворов и смесей солей минеральных веществ (таблицы 7, 8).

Таблица 7. — Приготовление солевой смеси А

Химическая формула соли	Навеска, г
CaCO ₃	12,49
MgSO ₄ 7H ₂ O	20,27
KH ₂ PO ₄	17,58
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	21,30
NaCl	16,52
KAl(SO ₄) ₂ 12 H ₂ O	1,76
Вес солевой смеси	89,92
Добавление в среду культивирования, г/л	0,90

Для приготовления солевой смеси А навески солей берут на технико-химических весах, тщательно перемешивают при растирании в ступке. Хранят в склянке с притертой пробкой.

Таблица 8. — Приготовление раствора солей Б

Химическая формула соли	Навеска, г/200 мл дистиллированной воды
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,4500
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2600
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0196
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,0308
NaF	0,0526
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,00 до 100 мг = 20 мг/мл, отсюда 1 мл до 100 мл = 0,2 мг/мл
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, раствор 0,2 мг/мл	1 мл/200 мл
KI готовится в день проведения исследования	0,1960 г до 100 мл = 1,96 мг/мл
KI , раствор 1,96 мг/мл	0,5 мл/200 мл
Добавление в среду культивирования, мл/л	2

Для приготовления раствора солей Б навески солей берут на аналитических весах, растворяют в подогретой дистиллированной воде в мерной колбе на 200 мл. После охлаждения до комнатной температуры раствор доводят до метки. Приготовленный таким образом раствор солей Б переносят в склянки с притертой пробкой и хранят в холодильнике. Раствор йодида калия готовят в день исследования. В 1 л среды культивирования добавляют 2 мл раствора солей Б, чем достигается содержание этих солей в 1 мл среды культивирования, соответствующее адекватному уровню потребления человеком.

В таблице 9 приведены прописи приготовления растворов витаминов, соответствующих адекватному уровню потребления.

Навески витаминов берут на аналитических весах. Витамины водорастворимые растворяют в подогретой дистиллированной воде, объем раствора 200 мл. Витамины жирорастворимые растворяют в этаноле, объем раствора 200 мл. В среду культивирования (1 л) добавляют по 2 мл смеси водо- и жирорастворимых витаминов. Растворы ВВ и ВЖ переливаются в склянки темного стекла с притертыми пробками и хранятся в холодильнике.

Таблица 9. — Приготовление растворов витаминов, соответствующих адекватному уровню потребления

Витамины	Приготовление стандартного раствора (стандарт)			Внесение в среду культивирования (СК) <i>Tetrahymena pyriformis</i>		
	навеска	H ₂ O, мл	концентрация	объем витамина, мл	объем СК, мл	концентрация в СК
Витамины водорастворимые (ВВ)						
B ₁	10 мг	до 200	0,0500 мг/мл	2	до 1000	0,0001 мг/мл
B ₂	10 мг	до 200	0,0500 мг/мл	2	до 1000	0,0001 мг/мл
B ₃ (PP)	100 мг	до 200	0,5000 мг/мл	2	до 1000	0,0001 мг/мл
B ₄ (холин-хлорид)	2500	до 200	12,5 мг/мл	2	до 1000	0,0250 мг/мл
B ₅	30 мг	до 200	0,1500 мг/мл	2	до 1000	0,0003 мг/мл
B ₆	10 мг	до 200	0,0500 мг/мл	2	до 1000	0,0001 мг/мл
B ₉ (B _с)	2 мг	до 200	10 мкг/мл	2	до 1000	0,0200 мкг/мл
B ₁₂	20 мг	до 100	200 мкг/мл	—	—	—
	200 мкг	до 10	20 мкг/мл	—	—	—
	20 мкг	до 200	0,1 мкг/мл	2	до 1000	0,0002 мкг/мл
B _н (биотин)	250 мг	до 100	2,5 мг/мл	—	—	—
	2,5 мг	до 10	250 мкг/мл	—	—	—
	250 мкг	до 200	1,25 мкг/мл	2	до 1000	0,0025 мкг/мл
B ₈ (инозит)	2500 мг	до 200	12,5 мг/мл	2	до 1000	0,0250 мг/мл
ПАБК	500 мг	до 200	2,5 мг/мл	2	до 1000	0,0050 мг/мл
С	450 мг	до 200	2,25 мг/мл	2	до 1000	0,0045 мг/мл
Витамины жирорастворимые (ВЖ) в этаноле						
А	4,5 мг	до 200	22,5 мкг/мл	2	до 1000	0,0450 мкг/мл
Е	80 мг	до 200	0,4 мг/мл	2	до 1000	0,0008 мг/мл
Д	50 мг	до 100	500 мкг/мл	—	—	—
	500 мкг	до 10	50 мкг/мл	—	—	—
	50 мкг	до 200	0,25 мкг/мл	2	до 1000	0,0005 мкг/мл
К	60 мг	до 100	600 мкг/мл	—	—	—
	600 мкг	до 200	3 мкг/мл	2	до 1000	0,0060 мкг/мл

1.3. Выбор среды сравнения для культивирования *Tetrahymena pyriformis* при оценке биологической ценности пищевой продукции

Выбор среды сравнения зависит от состава исследуемого продукта и цели эксперимента. При оценке биологической ценности и безвредности пищевой продукции предлагается использовать следующие среды сравнения.

Состав среды сравнения № 1: белок (казеин, молочный белок копреципитат, пептон казеиновый), углеводы (глюкоза, крахмал, мальтодекстрин), минеральные элементы, дрожжевой экстракт.

Состав среды сравнения № 2: белок (казеин, копреципитат, пептон), углеводы (глюкоза, крахмал, мальтодекстрин), минеральные элементы, витамины. Данную среду рекомендуется использовать при биотестировании витаминсодержащих специализированных пищевых продуктов.

Среды готовятся таким образом, чтобы содержание белка составляло 1, 2, 4 мг/мл. Соотношение белка и углеводов 1:4. Содержание минеральных элементов и витаминов согласно расчетам, приведенным в разделе 1.2 гл. 2.

ГЛАВА 3 ОБОРУДОВАНИЕ, ЛАБОРАТОРНАЯ ПОСУДА И МАТЕРИАЛЫ, РЕАКТИВЫ, КОМПОНЕНТЫ СРЕД

1. Для оценки безвредности и биологической ценности пищевой продукции используется нижеперечисленное оборудование, лабораторная посуда и материалы, растворы, реактивы:

1.1. Оборудование:

- термостат электрический воздушный, обеспечивающий температуру внутри камеры 25°C;
- шкаф сухо-тепловой стерилизационный для температурных режимов: 85±3°C 30+5 мин, 120±3°C 45+5 мин, 160±3°C 150+5 мин.
- иономер лабораторный (рН-метр), погрешность измерений рН±0,05;
- весы лабораторные электронные с диапазоном измерения от 0 до 200 г, погрешность измерений ±0,05–0,1 г;
- весы электронные аналитические, диапазон измерения 0,1–210 г;
- электропечь низкотемпературная лабораторная для сушки посуды;
- стиратель вибрационный;
- дозаторы пипеточные объемом 20–200; 100–1000; 1000–5000 мкл;
- микроскоп медицинский с увеличением 40–1000^x;
- термогигрометр для измерения относительной влажности, температуры и атмосферного давления;
- холодильник бытовой по ГОСТ 16317-87;
- электроплитка бытовая по ГОСТ 14919-83;
- мельница лабораторная.

1.2. Лабораторная посуда и материалы:

- бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026-76;
- колбы плоскодонные конические объемом 50–1000 мл со шлифом с притертыми пробками и без шлифа по ГОСТ 25336-82;
- колбы мерные объемом 25–2000 мл с притертыми пробками по ГОСТ 1770-74;
- пробирки стеклянные мерные с притертыми пробками объемом 10–20 мл по ГОСТ 1770-74;
- стаканы стеклянные объемом 50–1000 мл по ГОСТ 25336-82;

- ступки фарфоровые с пестиками разных размеров;
- сита лабораторные с диаметром ячейки 0,1 и 0,2 мм по ГОСТ 3826-82, ГОСТ 6613-86;
- маркеры водостойкие;
- наконечники к дозаторам по ГОСТ 21241-89;
- пипетки стерильные стеклянные или пластиковые объемом 1; 10 мл;
- пипетки стеклянные мерные на 1–10 мл по ГОСТ 20292-74;
- цилиндры мерные объемом 50-100 мл по ГОСТ 1770-74;
- пробирки бактериологические по ГОСТ 25336-82;
- пробки различных размеров: стеклянные, резиновые;
- спиртовки лабораторные стеклянные по ГОСТ 23932-90Е;
- стекла предметные по ГОСТ 9284;
- стекла покровные;
- камера Фукса–Розенталя;
- бюксы стеклянные;
- фильтры бумажные или ватно-марлевые;
- флаконы стеклянные на 10 мл;
- чашки биологические (Петри) по ГОСТ 23932-90Е;
- штативы для пробирок;
- вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556-81;
- бинт медицинский по СТБ 2144-2010;
- пинцеты анатомический и хирургический;
- палочки стеклянные.

1.3. Реактивы, витамины, компоненты сред:

- вода дистиллированная по ГОСТ 7609-72;
- пептон казеиновый микробиологический;
- казеин;
- копреципитат;
- натрий хлористый по ГОСТ 4233-77;
- натрия гидроокись по ГОСТ 4328-77;
- глюкоза безводная по ГОСТ 6038-79;
- калий хлористый по ГОСТ 4234-77;
- дрожжевой экстракт сухой;
- кальций углекислый по ГОСТ 4530-76;
- магний серноокислый 7-водный по ГОСТ 4523-77;
- медь (II) серноокислая 5-водная по ГОСТ 4165-78;
- марганец серноокислый по ГОСТ 435-77;
- цинк серноокислый по ГОСТ 4174-77;
- железо серноокисное 7-водное по ГОСТ 4148-78;
- калий фосфорнокислый двузамещенный по ГОСТ 2493-75;
- алюмокалиевые квасцы по ГОСТ 4329-77;
- калий йодистый по ГОСТ 4232-74;
- кобальт хлористый (II), 6-водный по ГОСТ 4525-77;
- натрий фтористый по ГОСТ 4463-76;
- пептон сухой микробиологический;

- спирт этиловый 96%;
- йода раствор спиртовой 50 мг/мл;
- холекальциферол (витамин D);
- ретинол (витамин A);
- викасол (витамин K);
- α-токоферол (витамин E);
- тиамин гидрохлорид (витамин B₁);
- рибофлавин (витамин B₂);
- никотиновая кислота (витамин PP);
- холин хлорид (витамин B₄);
- кальция пантотенат (витамин B₃);
- пиридоксин (витамин B₆);
- цианокобаламин (витамин B₁₂);
- биотин (витамин B_H);
- инозит (витамин B₈);
- парааминобензойная кислота;
- фолиевая кислота (витамин B_C);
- аскорбиновая кислота (витамин C).

Допускается применение оборудования и материалов с аналогичными по назначению техническими и метрологическими характеристиками для проведения исследований в соответствии с данным документом. При их применении следует руководствоваться рекомендациями изготовителя. Биологические препараты импортного производства должны иметь международный сертификат качества ИСО 9000 или EN 29000, препараты отечественного производства должны вырабатываться по нормативной документации, утвержденной в установленном порядке.

ГЛАВА 4 ПОДГОТОВКА К ПРОВЕДЕНИЮ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Подготовка маточной культуры *Tetrahymena pyriformis*

При работе с культурой *Tetrahymena pyriformis* необходимо строгое соблюдение стерильности. Исследования осуществляются с соблюдением правил асептики. Работают со стерильной посудой, стерильными инструментами и пипетками, над спиртовкой. Работы должны проводиться в боксированных помещениях, однако целесообразней для создания стерильных условий использовать ламинарный бокс.

Культура *Tetrahymena pyriformis* требует к себе большого внимания, ибо от ее сохранности и качества зависит исход всех последующих исследований. Наиболее надежный способ хранения культуры — систематический пересев ее на новую питательную среду.

Маточная культура инфузорий выращивается при температуре 25°C в питательной среде следующего состава:

- среда А: пептон — 2,0 г, глюкоза — 0,5 г, натрий хлористый — 0,1 г, дрожжевой экстракт — 0,1 г, дистиллированная вода — до 1 л;

- среда Б: пептон — 20,0 г, глюкоза — 5,0 г, натрий хлористый — 1,0 г, дрожжевой экстракт — 1 г, дистиллированная вода — до 1 л; рН среды А и Б доводят до 7,1–7,2. После этого среду разливают по 10 мл в стерильные конические колбочки на 50 мл с ватно-марлевыми пробками и подвергают тиндализации, выдерживая четырежды при 85°С в течение 30 мин с интервалом в 1 сут. В промежутках между нагреваниями колбочки хранят при комнатной температуре. Колбочки со средой можно хранить в холодильнике при 4±2°С в течение 1 мес.

Для получения достоверных результатов необходимо работать с чистой культурой инфузорий. Проверку культуры на стерильность производят путем посева на мясопептонный агар, сусло-агар, бульон. В случае загрязнения культуры микрофлорой (плесени, грибки, бактерии), приводящего к изменению чувствительности инфузорий к воздействию изучаемых факторов или даже к гибели *Tetrahymena pyriformis*, ее очищают антибиотиками, к которым загрязняющая культуру микрофлора проявила чувствительность, или вытяжками из растительного сырья, обладающего бактерицидным действием.

Пример использования антибиотиков. Стрептомицин — 1000 ед./л; хлортетрациклин — 50–100 мг/л; пенициллин — 200 ед./л или биомицин — 1 мг/л.

Для подсчета инфузорий используют камеру Фукса–Розенталя. Считают под микроскопом при увеличении: объектив — 10, окуляр — 10. Инфузории предварительно фиксируют 5% спиртовым раствором йода. Для этого 1 мл культуры вносят в 10-миллиметровый флакончик, добавляют каплю раствора йода. Флакончик закрывают пробкой и встряхивают. Фиксированную культуру вводят в камеру. Подсчитывают число инфузорий в 10 больших квадратах по диагонали. Умножая среднее число инфузорий в одном квадрате на 5000, находят число инфузорий в 1 мл культуры. При необходимости можно развести культуру, добавив 3 мл 0,1% раствора NaCl (0,5 г хлорида натрия растворяется в 500 мл дистиллированной воды). Тогда при подсчете культуры среднее число инфузорий в одном квадрате умножают на 20000.

Пересев маточной культуры производится одноразовыми стерильными серологическими пипетками на 1 мл 2 раза в неделю, например, в понедельник и пятницу; 0,2 мл культуры инфузорий, выращенной в среде А, пересеивается в среду Б; 0,2 мл культуры инфузорий, выращенной в среде Б, пересеивается в среду А. Такое чередование позволяет длительное время поддерживать жизнедеятельность инфузорий на оптимальном уровне.

2. Подготовка посуды

Чистота посуды достигается путем тщательной мойки проточной водопроводной, затем дистиллированной водой. В качестве моющих средств используется хромовая смесь или детергенты, предназначенные для культуры клеток, после чего посуда тщательно моется и прополаскивается водопроводной водой не менее 20 раз и дистиллированной — трех раз. Использование стиральных порошков, паст, поверхностно-активных веществ исключается. Сушка чистой посуды осуществляется в электропечи низкотемпературной лабораторной при температуре 100°С.

Вымытые и высушенные колбы закрывают ватно-марлевыми пробками и стерилизуют при 160°C в течение 2,5 ч.

Ватно-марлевые пробки для каждой серии экспериментов готовят заново.

ГЛАВА 5

ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОЦЕНКИ НА *TETRAHYMENA PYRIFORMIS* БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЦЕННОСТИ И БЕЗВРЕДНОСТИ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

1. Исследование пищевых продуктов растительного происхождения

Отбор проб и составление среднего образца осуществляют согласно действующей на период проведения анализа нормативно-технической документации.

Подготовка образцов для анализа заключается в тщательном измельчении продукта до размера частиц, не превышающих 0,2 мм.

Исследование осуществляется с соблюдением правил асептики. Вся посуда, используемая при подготовке проб (тарелки, терка, блендер, ложки, ножи, ступки и др.), обрабатывается спиртом этиловым медицинским; лабораторная посуда (цилиндры, стаканы, колбы, воронки и др.) подвергается суховоздушной стерилизации при 120°C в течение 45 мин. Дистиллированная вода, используемая для разведения гомогенатов, кипятится в течение 15 мин.

1.1. Подготовка проб зерна злаковых культур

Для исследования биологической ценности и безвредности зерна и продуктов его переработки на *Tetrahymena pyriformis* содержание продукта в среде культивирования должно составлять 7,5; 15; 30 и 40 мг/мл (содержание белка в среде при этом 0,75; 1,5; 3,0 и 4,0 мг/мл). Такое содержание зерна в среде культивирования *Tetrahymena pyriformis* в экстраполяции на человека соответствует его суточному потреблению 150; 300; 600 и 800 г.

Отобранное зерно промывают этиловым спиртом, высушивают и измельчают: сначала в лабораторной зерновой мельнице дважды по 5 мин, затем в микроизмельчителе типа «Истиратель вибрационный ИВ-1» в течение 25 мин. Измельченное зерно просеивают через сито с величиной ячеек 200 мкм. Берется навеска зерна 10,0 г, помещается в ступку, где дополнительно растирается с теплой прокипяченной дистиллированной водой. Вода добавляется порциями. Конечный объем гомогената — 100 мл, концентрация — 100 мг/мл. Исходная рН доводится 1 N раствором NaOH до 7,1–7,2 под контролем рН-метра.

Разведение гомогената осуществляется по схеме, приведенной в таблице 10.

Таблица 10. — Разведение гомогената зерна

Гомогенат		Дистиллированная вода, мл	Рабочая концентрация (содержание продукта в среде культивирования), мг/мл
мг/мл	мл		
100	20	30	40
100	30	70	30
30	50	50	15
15	50	50	7,5

В таблице 11 приведены данные пищевой и энергетической ценности среды культивирования *Tetrahymena pyriformis* на основе зерна злаковых культур.

Таблица 11. — Пищевая и энергетическая ценность среды культивирования *Tetrahymena pyriformis* на основе зерна злаковых культур

Зерно, мг/мл	Белки, мг/мл	Жиры, мг/мл	Углеводы, мг/мл	Кал/мл
7,5	0,75	0,225	3,75	20
15	1,50	0,45	7,50	40
30	3,00	0,90	15,00	80
40	4,00	1,20	20,00	108

Каждая концентрация гомогената готовится в трех повторностях. Пробы разливаются по 10 мл в стерильные колбочки на 50 мл и четырежды выдерживаются в термостате при 85°C в течение 30 мин с интервалом 1 сут (тиндализация). В промежутках между нагреваниями колбочки хранят при комнатной температуре.

После охлаждения в каждую пробу вносят по 20000 инфузорий трехсуточной культуры *Tetrahymena pyriformis*, культивируемой в среде Б (2000 инфузорий/мл). Пробы помещаются в термостат с вентиляцией при 25±0,1°C на 4 сут. Анализ и оценка результата осуществляются на этапах интерфазной активности *Tetrahymena pyriformis* через 24; 48; 72 и 96 ч.

1.2. Подготовка проб картофеля

Клубни картофеля тщательно промываются проточной водопроводной водой, затем дистиллированной, обсушиваются чистыми салфетками или полотенцем, обмываются спиртом этиловым медицинским на фаянсовой тарелке и обжигаются. Часть клубней исследуется сырыми, вторая часть – варится в дистиллированной воде в кожуре до готовности.

Далее сырой и вареный картофель исследуются по единой схеме.

Картофель, сырой и вареный, исследуется в концентрациях 12,5; 25; 40; 50; 100; 200 мг/мл, обеспечивающих содержание белка в среде культивирования *Tetrahymena pyriformis* 0,25; 0,50; 0,80; 1; 2; 4 мг/мл.

После гомогенизации в блендере навеска картофеля 40,00 г помещается в ступку, где дополнительно растирается с теплой дистиллированной водой. Вода добавляется порциями. Конечный объем гомогената — 200 мл, концентрация — 200 мг/мл. Исходная рН доводится 1 N раствором NaOH до 7,1–7,2. Разведение гомогената осуществляется по схеме, приведенной в таблице 12.

Таблица 12. — Разведение гомогената картофеля

Гомогенат		Дистиллированная вода, мл	Рабочая концентрация, мг/мл
мг/мл	мл		
200	200	–	200
200	50	50	100
100	50	50	50
200	20	80	40
50	50	50	25
25	50	50	12,5

Концентрации картофеля в среде культивирования 12,5; 25; 40 мг/мл эквивалентны потреблению его с рационом энергетической ценности 2000; 4000; 5000 ккал. Пробы, содержащие картофель в концентрациях 50; 100; 200 мг/мл, анализируются при оценке биологической ценности картофеля (таблица 13).

Таблица 13. — Пищевая и энергетическая ценность среды культивирования *Tetrahymena pyriformis* на основе картофеля

Гомогенат, мг/мл	Белки, мг/мл	Жиры, мг/мл	Углеводы, мг/мл	Кал/мл
Картофель сырой и вареный				
12,5	0,25	0	2,00	10
25	0,50	0	4,00	20
40	0,80	0	6,40	32
50	1,00	0	8,00	40
100	2,00	0	16,00	80
200	4,00	0	32,00	160

Каждая концентрация гомогената готовится в трех повторностях. Пробы разливаются по 10 мл в стерильные колбочки на 50 мл и четырежды выдерживаются в термостате при 85°C в течение 30 мин с интервалом 1 сут (тиндаллизация). В промежутках между нагреваниями колбочки хранят при комнатной температуре.

После охлаждения в каждую пробу вносят по 20000 инфузорий трехсуточной культуры *Tetrahymena pyriformis*, культивируемой в среде Б (2000 инфузорий/мл). Пробы помещаются в термостат с вентиляцией при 25±0,1°C на

4 сут. Анализ и оценка результата осуществляются на этапах интерфазной активности *Tetrahymena pyriformis* через 24; 48; 72 и 96 ч.

1.3. Подготовка проб плодоовощной продукции

Подготовку проб плодоовощной продукции осуществляют, используя методические приемы как при исследовании картофеля, с соблюдением правил асептики. Свеклу и капусту исследуют в сыром и вареном виде.

Содержание плодов и овощей в среде культивирования *Tetrahymena pyriformis*, эквивалентное рационам энергетической ценности 2000; 4000 и 8000 ккал, составляет 12,5; 25; 50 мг/мл для плодов и 25; 50; 100 мг/мл для овощей.

Плодоовощная продукция исследуется также в концентрациях, соответствующих уровням белка в среде культивирования 1; 2; 4 мг/мл, используемым для расчета биологической ценности пищевой продукции (таблица 14).

Таблица 14. — Характеристика среды культивирования *Tetrahymena pyriformis* на основе плодоовощной продукции

Гомогенат, мг/мл	Белки, мг/мл	Жиры, мг/мл	Углеводы, мг/мл	Кал/мл
Яблоки				
25	0,1	0,1	2,5	11
50	0,2	0,2	5	22
100	0,4	0,4	10	45
250	1,0	1,0	25	110
500	2,0	2,0	50	220
Сливы				
25	0,2	0	2,4	11
50	0,4	0	4,8	22
100	0,8	0	9,6	43
125	1,0	0	12	55
250	2,0	0	24	110
500	4,0	0	48	220
Огурцы грунтовые				
12,5	0,1	0,0125	0,325	25,5
25	0,2	0,025	0,65	3,5
50	0,4	0,05	1,3	7
125	1,0	0,125	3,25	260
250	2,0	0,25	6,5	520
500	4,0	0,5	13	1040
Томаты грунтовые				
12,5	0,125	0,025	0,475	2,875
25	0,25	0,05	0,95	5,75
50	0,5	0,1	1,9	11,5
100	1,0	0,2	3,8	23
200	2,0	0,4	7,6	46
400	4,0	0,8	15,2	92

Капуста белокочанная				
12,5	0,25	0,0125	0,5875	3,5
25	0,5	0,025	1,175	7
50	1,0	0,05	2,35	14
100	2,0	0,1	4,7	28
200	4,0	0,2	9,4	56
Свекла столовая				
12,5	0,25	0	1,125	5,5
25	0,5	0	2,25	11
50	1,0	0	4,5	22
100	2,0	0	9	44
200	4,0	0	18	88

Приготовление гомогенатов плодоовощной продукции и их тиндализация осуществляются так же, как и картофеля. Величина навески определяется концентрацией, обеспечивающей содержание белка в среде культивирования инфузорий 4 мг/мл. Так, при необходимости приготовить гомогенат концентрации 500 мг/мл берется навеска 125 г, объем доводится до 250 мл.

Каждая концентрация гомогената готовится в трех повторностях. Пробы разливаются по 10 мл в стерильные колбочки на 50 мл и четырежды выдерживаются в термостате при 85°C в течение 30 мин с интервалом 1 сут (тиндализация). В промежутках между нагреваниями колбочки хранят при комнатной температуре.

После охлаждения в каждую пробу вносят по 20000 инфузорий трехсуточной культуры *Tetrahymena pyriformis*, культивируемой в среде Б (2000 инфузорий/мл). Пробы помещаются в термостат с вентиляцией при 25±0,1°C на 4 сут. Анализ и оценка результата осуществляются на этапах интерфазной активности *Tetrahymena pyriformis* через 24; 48; 72 и 96 ч.

ГЛАВА 6

ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОЦЕНКИ НА *TETRAHYMENA PYRIFORMIS* БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЦЕННОСТИ И БЕЗВРЕДНОСТИ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ.

1. Подготовка проб продуктов животного происхождения

Отбор проб и составление среднего образца осуществляют согласно действующей на период проведения анализа нормативно-технической документации.

Исследование осуществляется с соблюдением правил асептики. Вся посуда, используемая при подготовке проб (тарелки, блендер, ложки, ножи, ступки, детали мясорубки и др.), обрабатывается спиртом этиловым медицинским; лабораторная посуда (цилиндры, стаканы, колбы, воронки и др.) подвергается суховоздушной стерилизации при 120°C в течение 45 мин. Дистиллированная вода, используемая для разведения гомогенатов, кипятится в течение 15 мин.

Содержание мясных продуктов в среде культивирования *Tetrahymena pyriformis*, эквивалентное рационам энергетической ценности 2000; 4000 и 8000 ккал, составляет 7, 14, 28 мг/мл (определение безвредности).

Мясная продукция исследуется также в концентрациях, соответствующих уровням белка в среде культивирования 1; 2; 4 мг/мл, используемых для расчета биологической ценности. Содержание основных пищевых веществ в сырых мясных продуктах определяется по справочным таблицам, в колбасных изделиях — по информации, приведенной на этикетке.

Мясные полуфабрикаты (куски 0,5–1 кг) и целые батоны колбасных изделий промываются дистиллированной водой, обсушиваются марлевыми салфетками, затем обмываются медицинским спиртом на фаянсовой тарелке и сушатся на воздухе. Куски полуфабрикатов делятся пополам. Одна половина варится в дистиллированной воде. Длительность варки птицы – 0,5 ч, мяса – 1,5 ч. Вторая половина проходит дальнейшую обработку без варки. Сырое и вареное мясо исследуется по единой схеме.

Образцы колбасных изделий для исследования вырезаются из центральной части батона.

Подготовленные образцы мяса и колбас четырежды пропускаются через электромясорубку.

Навески фарша мясных полуфабрикатов по 2,0 г помещаются в фарфоровые ступки и тщательно растираются с прокипяченной и остуженной дистиллированной водой. Вода во время растирания добавляется небольшими порциями. Общий объем гомогената — 100 мл.

Исходная рН доводится до 7,2 1 N раствором NaOH. Путем двух последовательных разведений исходного гомогената в два раза готовятся пробы с содержанием белка 2 и 1 мг/мл.

Аналогичным образом готовятся пробы колбасных изделий. Величина навески определяется максимальной концентрацией, необходимой для проведения исследования.

Каждая концентрация гомогената готовится в трех повторностях. Пробы разливаются по 10 мл в стерильные колбочки на 50 мл и четырежды выдерживаются в термостате при 85°C в течение 30 мин с интервалом 1 сут (тиндализация). В промежутках между нагреваниями колбочки хранят при комнатной температуре.

После охлаждения в каждую пробу вносят по 20000 инфузорий трехсуточной культуры *Tetrahymena pyriformis*, культивируемой в среде Б (2000 инфузорий/мл). Пробы помещаются в термостат с вентиляцией при 25±0,1°C на 4 сут. Анализ и оценка результата осуществляются на этапах интерфазной активности *Tetrahymena pyriformis* через 24; 48; 72 и 96 ч.

1.1. Подготовка проб рыбы и рыбопродуктов

Содержание рыбы и рыбопродуктов в среде культивирования *Tetrahymena pyriformis*, эквивалентное рационам энергетической ценности 2000; 4000 и 8000 ккал, составляет 7; 14; 28 мг/мл (определение безвредности).

Рыба и рыбопродукты исследуются также в концентрациях, соответствующих уровням белка в среде культивирования 1; 2; 4 мг/мл,

используемых для расчета биологической ценности. Содержание основных пищевых веществ в сырой рыбе определяется по справочным таблицам, в рыбных консервах – по информации, приведенной на этикетке.

Мороженая рыба размораживается при комнатной температуре, охлажденная и свежая исследуется сразу. Рыба очищается, отделяются голова, внутренности и кости. Далее образец промывается дистиллированной водой, обсушивается марлевыми салфетками, затем обмывается медицинским спиртом на фаянсовой тарелке и сушится на воздухе. Куски рыбы делятся пополам. Одна половина варится в дистиллированной воде. Длительность варки — 0,5 ч. Вторая половина проходит дальнейшую обработку без варки.

Банка с рыбными консервами обрабатывается спиртом этиловым ректифицированным, вскрывается, жидкая часть сливается.

Подготовленные образцы рыбы и рыбных консервов измельчаются при помощи блендера.

Далее приготовление гомогенатов рыбы и рыбопродуктов осуществляется так же, как и мясной продукции. Величина навески определяется максимальной концентрацией, необходимой для проведения исследования.

Каждая концентрация гомогената готовится в трех повторностях. Пробы разливаются по 10 мл в стерильные колбочки на 50 мл и четырежды выдерживаются в термостате при 85°C в течение 30 мин с интервалом 1 сут (тиндализация). В промежутках между нагреваниями колбочки хранят при комнатной температуре.

После охлаждения в каждую пробу вносят по 20000 инфузорий трехсуточной культуры *Tetrahymena pyriformis*, культивируемой в среде Б (2000 инфузорий/мл). Пробы помещаются в термостат с вентиляцией при 25±0,1°C на 4 сут. Анализ и оценка результата осуществляются на этапах интерфазной активности *Tetrahymena pyriformis* через 24; 48; 72 и 96 ч.

1.2. Подготовка проб морепродуктов

Содержание морепродуктов в среде культивирования *Tetrahymena pyriformis*, эквивалентное рационам энергетической ценности 2000; 4000 и 8000 ккал, составляет 7; 14; 28 мг/мл (определение безвредности).

Морепродукты исследуются также в концентрациях, обеспечивающих уровень белка в среде культивирования 1; 2; 4 мг/мл, используемых для расчета биологической ценности. Содержание основных пищевых веществ в сырых морепродуктах определяется по справочным таблицам, в консервах — по информации, приведенной на этикетке.

Пробоподготовка морепродуктов и их гомогенатов осуществляется с применением методических подходов, как для рыбной продукции. Сырые морепродукты исследуются в сыром и вареном виде по единой схеме. Длительность варки определяется видом морепродукта. Величина навески определяется максимальной концентрацией, необходимой для проведения исследования.

Каждая концентрация гомогената готовится в трех повторностях. Пробы разливаются по 10 мл в стерильные колбочки на 50 мл и четырежды

выдерживаются в термостате при 85°C в течение 30 мин с интервалом 1 сут (тиндализация). В промежутках между нагреваниями колбочки хранят при комнатной температуре.

После охлаждения в каждую пробу вносят по 20000 инфузорий трехсуточной культуры *Tetrahymena pyriformis*, культивируемой в среде Б (2000 инфузорий/мл). Пробы помещаются в термостат с вентиляцией при 25±0,1°C на 4 сут. Анализ и оценка результата осуществляются на этапах интерфазной активности *Tetrahymena pyriformis* через 24; 48; 72 и 96 ч.

ГЛАВА 7

ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОЦЕНКИ НА *TETRAHYMENA PYRIFORMIS* БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЦЕННОСТИ И БЕЗВРЕДНОСТИ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЙ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ

1. Отбор проб и составление среднего образца осуществляют согласно действующей на период проведения анализа нормативно-технической документации.

Исследование выполняют с соблюдением правил асептики. Лабораторная посуда (цилиндры, стаканы, колбы, воронки, ступки и др.) подвергается суховоздушной стерилизации при 120°C в течение 45 мин. Дистиллированная вода, используемая для разведения гомогенатов, кипятится в течение 15 мин, охлаждается.

Содержание основных пищевых веществ в образцах пищевой продукции детского питания определяют по сведениям, приведенным на этикетке.

2. Безвредность продуктов детского питания исследуется в концентрациях, соответствующих суточному потреблению их детьми первого года жизни, а также обеспечивающих содержание белка в среде культивирования 1; 2; 4 мг/мл, необходимых для расчета биологической ценности продукта. При этом учитываются такие критерии, как рекомендуемые суточные нормы потребления определенной группы продуктов для детей первого года жизни в зависимости от возраста; рекомендации по приготовлению данного продукта, приведенные на этикетке; фактическая пищевая ценность исследуемого продукта. Содержание пищевых продуктов в среде культивирования *Tetrahymena pyriformis* рассчитывается с учетом коэффициента экстраполяции (таблица 15).

$$K_{\text{экстр.}} = \frac{N_{\text{белка}}}{4}, \quad (1)$$

где $K_{\text{экстр}}$ — коэффициент экстраполяции;

$N_{\text{белка}}$ — норма потребления белка в сутки (мг);

4 — содержание белка в среде культивирования *Tetrahymena pyriformis*.

$$D_{инф} \equiv \frac{D_{чел}}{K_{экстр}}, \quad (2)$$

где $D_{инф}$ — содержание продукта в среде культивирования *Tetrahymena pyriformis* (мг/мл);

$D_{чел}$ — суточное потребление продукта человеком (мг).

Норма потребления белков рассчитывается в соответствии с Санитарными нормами и правилами «Требования к питанию населения: нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Республики Беларусь», утвержденными постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь 20.11.2012 № 180.

Таблица 15. — Коэффициент экстраполяции в зависимости от возраста ребенка

Возраст ребенка, мес.	Средний вес, кг	Норма потребления белка, г/сут	Коэффициент экстраполяции
1	4,0	9	2250
2	5,0	11	2750
3	5,5	12	3000
4	6,0	16	4000
5	7,0	18	4500
6	7,5	20	5000
7	8,0	23	5750
8	8,5	25	6250
9	9,0	26	6500
10	9,5	28	7000
11	10,0	29	7250
12	10,5	30	7500

Пример. Пищевая и энергетическая ценность каши гречневой безмолочной быстрорастворимой для питания детей с 4 мес. приведена на маркировке (таблица 16).

Таблица 16. — Содержание основных пищевых веществ в образце каши гречневой безмолочной быстрорастворимой для детского питания (сведения, приведенные на этикетке)

Образец	Белки, г/100 г	Жиры, г/100 г	Углеводы, г/100 г	Энергетическая ценность, ккал/100 г
Каша гречневая безмолочная	8,0	1,0	79,0	357

В таблице 17 приведены данные о пищевой и энергетической ценности среды культивирования *Tetrahymena pyriformis* на основе каши гречневой безмолочной быстрорастворимой для питания детей с 4 мес. Способ приготовления каши (сведения, приведенные на этикетке): 180 мл воды + 25 г каши. Детей 4 мес. рекомендуется кормить кашей 1 раз в сут.

Таблица 17. — Характеристика среды культивирования *Tetrahymena pyriformis* на основе каши гречневой безмолочной быстрорастворимой для детского питания

Концентрация гомогената, мг/мл				
	Б, мг/мл	Ж, мг/мл	У, мг/мл	ЭЦ, кал/мл
50,0	4,0	0,50	39,5	178,5
25,0	2,0	0,25	19,8	89,25
12,5	1,0	0,13	9,9	44,6
6,25	0,5	0,06	4,9	22,3

Для исследования данной каши гречневой берется навеска 5 г. Содержание белка в приготовленном гомогенате будет составлять 4 мг/мл.

Образцы продуктов для детского питания вскрываются с соблюдением правил асептики. Необходимые навески помещаются в фарфоровые ступки и тщательно растираются с подготовленной дистиллированной водой. Вода во время растирания добавляется небольшими порциями. Общий объем гомогената — 100 мл. Гомогенат помещается в стерильную колбу на 100 мл. Содержание белка составляет 4 мг/мл.

Исходная рН доводится до 7,2 1 N раствором NaOH или 0,1 N HCl. Путем последовательных разведений исходного гомогената готовятся пробы с необходимым содержанием белка. Для разведения используется прокипяченная и остуженная дистиллированная вода с рН 7,2.

Каждая концентрация гомогената готовится в трех повторностях. Пробы разливаются по 10 мл в стерильные колбочки на 50 мл и четырежды выдерживаются в термостате при 85°C в течение 30 мин с интервалом 1 сут (тиндализация). В промежутках колбочки хранятся в боксе при комнатной температуре. Консервы на овощной основе выдерживаются в течение 30 мин при температуре 85°C однократно (пастеризация).

После охлаждения в каждую пробу вносят по 20 000 инфузорий трехсуточной культуры *Tetrahymena pyriformis*, культивируемой в среде Б (2000 инфузорий/мл). Пробы помещаются в термостат с вентиляцией при 25±0,1°C на 4 сут. Анализ и оценка результата осуществляются на этапах интерфазной активности *Tetrahymena pyriformis* через 24; 48; 72 и 96 ч.

ГЛАВА 8 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Пищевые продукты являются единственным источником питательных веществ в среде культивирования *Tetrahymena pyriformis*. Безвредность пищевых продуктов исследуют на протяжении жизненного цикла популяции *Tetrahymena pyriformis*. Осуществляют визуальный анализ состояния одноклеточных организмов, графический анализ кривой роста популяции и математический анализ основных показателей жизнедеятельности популяции (константа мгновенной скорости роста, время генерации, число поколений, численность популяции), культивируемой в среде, содержащей исследуемые образцы продуктов.

В нативном препарате отмечают состояние организмов: наличие погибших, характер морфологических и функциональных изменений.

Морфологические изменения:

- внешняя форма организмов: нормальная, округлая, листовидная, змеевидная, квадратная, дисковидная, наличие выпячиваний, вакуолизация, сморщивание и другие изменения;

- размер: нормальный, мелкий, крупный.

Функциональные изменения:

- подвижность, характер движения: нормальное, замедленное, вращательное, маятникообразное, броуновское, резкое изменение направления, вздрагивание;

- распределение в капле: верхняя часть, нижняя часть, в центре, по краям;

- состояние сократительной вакуоли.

После фиксации одной каплей 5% раствора йода и добавления при необходимости 3 мл 0,1% раствора NaCl подсчитывают число организмов в счетной камере Фукса-Розенталя в 10 больших квадратах. Умножая среднее число организмов в 1 квадрате на 5000, если не NaCl добавлялся, или на 20000 при разведении в 4 раза, получают число особей в 1 мл культуры.

Математическую обработку результатов подсчета инфузорий проводят по специально разработанной программе на персональном компьютере или используют следующие формулы:

$$r = \ln \frac{N_t}{2000} : t; \quad n = \ln \frac{N_t}{2000} : \ln 2; \quad g = \frac{t}{n}, \quad (3)$$

где 2000 — число организмов, внесенное в 1 мл среды культивирования;

N_t — число организмов в 1 мл среды культивирования с исследуемым образцом через время t ;

r — константа мгновенной скорости роста;

n — число поколений;

g — время генерации.

Рассчитывают биотический потенциал (БП) популяции на этапах интерфазной активности и относительную биологическую ценность (ОБЦ) опытных образцов пищевых продуктов по отношению к контрольным, стандартизованную относительную биологическую ценность (СОБЦ) пищевых продуктов по отношению к стандартному белку, коэффициент эффективности белка (КЭБ).

При расчете показателей биологической ценности принимается во внимание отсутствие каких-либо проявлений вредного воздействия продукта на *Tetrahymena pyriformis*. При этом учитываются результаты определения скорости роста, биотического потенциала, численности популяции *Tetrahymena pyriformis* на этапах жизненного цикла. Показатели СОБЦ и КЭБ рассчитываются на том этапе жизненного цикла тест-объекта и на той концентрации продукта, при которых величина БП является максимальной, обычно через 72–96 ч инкубации при содержании белка в среде культивирования 4 мг/мл.

БП — величина прироста популяции за единицу времени в расчете на 1 особь. При идеальных условиях, когда ресурсы среды ничем не ограничены, эта величина стабильна. БП характеризует внутреннюю потенциальную способность данной популяции к росту. Рассчитывается по формуле:

$$БП = \frac{N_t}{2000} : t. \quad (4)$$

ОБЦ — относительная биологическая ценность опытных образцов продуктов в % по отношению к контрольным образцам. Рассчитывается по формуле:

$$ОБЦ = \frac{N_{ot}}{N_k} \times 100, \quad (5)$$

где N_{ot} — число организмов в 1 мл среды, содержащей исследуемый продукт;
 N_k — число организмов в контроле.

СОБЦ — стандартизованная относительная биологическая ценность продукта определяется отношением числа инфузорий, выросших на исследуемом продукте, к числу инфузорий, выросших в стандартной среде с идентичным содержанием белка, умноженным на 100:

$$СОБЦ = \frac{N_{ot}}{N_c} \times 100. \quad (6)$$

КЭБ — коэффициент эффективности белка определяется отношением числа инфузорий в 1 мл среды культивирования, содержащей исследуемый продукт, к количеству белка в 1 мл пробы, деленным на 100000.

Полученные экспериментальные данные обрабатывают статистически с определением средней арифметической каждого вариационного ряда (\bar{X}), среднеквадратичного отклонения (S), стандартной ошибки (m), коэффициента вариации (V) и установления степени вероятности нулевой гипотезы по сравнению с контролем или со стандартом путем вычисления критерия Стьюдента-Фишера (t). При уровне значимости $p < 0,05$, определенном с использованием справочных таблиц, различие средних арифметических сравниваемых рядов считают статистически достоверными.