

## ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ХАРЧОВИХ АРОМАТИЗАТОРІВ РІЗНИХ ВИРОБНИКІВ ЩОДО МУТАГЕННОЇ АКТИВНОСТІ

І. Боднар\*, О. Ільков, С. Горбулінська, Л. Боднар

Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: bodivas@gmail.com

Досліджено мутагенну активність зразків натурально-ідентичних харчових ароматизаторів «Шоколад» фірм «Etol» та «Akras» і «Темний шоколад» фірми «Givaudan». Ароматизатор «Шоколад» фірми «Etol» в ана-телофазному тесті на *Allium cepa* проявив токсичний ефект, спричинив появу хромосомних аберацій різних типів – хромосомних і хроматидних фрагментів, дицентриків, а також показав збільшення кількості незапліднених яєць та збільшення вдвічі частоти домінантних летальних мутацій порівняно з контролем у *Drosophila melanogaster*. Мутагенний ефект ароматизатора «Шоколад» фірми «Akras» виявлений лише для дози, збільшеної у 10 разів від добової; виявлено найвищі показники частоти домінантних летальних мутацій і збільшення кількості незапліднених яєць у *D. melanogaster*. Ароматизатор «Темний шоколад» фірми «Givaudan» проявив найменший мутагенний ефект на двох тест-системах, порівняно з ароматизаторами інших фірм, які описані вище.

*Ключові слова:* ароматизатори продуктів харчування, домінантні летальні мутації, ана-телофазний аналіз, хромосомні аберації.

На сьогоднішній день відомо більш ніж 3000 найменувань харчових ароматизаторів, які масово використовуються у виготовленні продуктів харчування, є різними за хімічним складом, серед них трапляються сполуки з мутагенними або канцерогенними властивостями. Актуальним є створення і впровадження в харчову промисловість нових безпечних для людини харчових добавок та розробка інформативних систем їх оцінки і сучасне тестування [8, 12]. Більшість харчових добавок не мають харчової цінності і в кращому випадку є біологічно інертними для організму, а в гіршому – виявляють біологічну активність. Багато з них виявилися сильними канцерогенами [2, 4, 7].

Дедалі ширше застосовують у харчовій промисловості ароматизатори. Харчові ароматизатори – це допоміжні речовини у виробництві фармацевтичних препаратів і продуктів харчування, які використовують у технологічному процесі для поліпшення запаху та смаку готової продукції [1, 5]. До складу ароматизаторів можуть входити, окрім хімічних сполук або їх сумішей, виділених із натуральної сировини, і такі хімічно синтезовані речовини, як: галова кислота, пропіленгліколь, бензойна кислота, нітрит натрію, аскорбінова кислота й інші [13]. Для більшості з цих речовин наявні дані про мутагенну активність, яка встановлена на різних тест-об'єктах [3, 5, 14]. Метою даної роботи було дослідити мутагенну активність ароматизаторів «Шоколад» різних виробників і виявити більш безпечні для використання в харчовій промисловості.

### Матеріали та методи

Матеріалами для досліджень слугували розчини харчових ідентично-натуральних ароматизаторів: «Шоколад» фірми «Etol» (Словенія), «Шоколад» фірми «Akras» (Австрія) і «Темний шоколад» фірми «Givaudan» (Швейцарія). Продукція цих фірм широко використовується у Європі та в Україні, зокрема.

Відомо, що деякими складовими ароматизатора «Шоколад» фірми «Etol» є такі хімічні речовини: масляна кислота, діацетил, дигідрокумарин, гаммаокталактон, етилбутират. Склад ароматизатора «Шоколад» фірмою «Акрас» не розголошується. Фірма «Givaudan» також не розголошує склад своєї продукції, проте відомо, що дане виробництво засноване на використанні виключно натуральної сировини. Дослідні концентрації зразків обчислювали таким чином: рекомендовану технологічну дозу, яка розрахована на 1 кг продукції, зменшували вдвічі (враховуючи, що за день людина може спожити не більше півкілограма готової продукції) і множили на середню масу людини (70 кг). Така концентрація нами названа добовою. Досліджували також дозу, збільшену в 10 разів від добової [1].

Для аналізу мутагенного ефекту використовували такі методи: метод домінантних летальних мутацій (ДЛМ) на *Drosophila melanogaster* і ана-телофазний аналіз на меристемних клітинах корінців *Allium cepa*.

Суть методу ДЛМ полягає у порівнянні частоти виникнення домінантних летальних мутацій у контролі та під дією досліджуваних речовин. Домінантні летальні мутації – це збірна група різноманітних пошкоджень генетичного матеріалу, до якої належать анеуплоїдія за аутосомами, асиметричні транслокації, великі делеції, втрата цілих хромосом [6]. Частота виникнення домінантних леталей залежить від стадії сперматогенезу. Для постановки однієї серії експерименту в поживне середовище вносили розчини досліджуваних ароматизаторів певної концентрації; личинки активно жилися, заляльковувалися, із них відбирали самців, яких схрещували з інтактними віргінними самками. У свіжих яйцекладках підраховували кількість відкладених яєць, а потім після 48 год термостатування ( $t=24^{\circ}\text{C}$ ) – кількість яєць, що не розвивалися. Серед нерозвинутих розрізняли незапліднені (прозорі), яйця з ранньою (матові) та пізньою (з кольоровим відтінком) ембріональною загибеллю. Частоту домінантних леталей визначали за співвідношенням кількості яєць із ДЛМ до кількості запліднених яєць у відсотках [6].

Суть ана-телофазного методу на меристемних клітинах корінців *Allium cepa* полягає у виявленні хромосомних аберацій при пророщуванні насінин на досліджуваних субстратах. Контролем слугувала дистильована вода. Пророщували насіння при температурі  $22^{\circ}\text{C}$ . Відсутність проростання насіння протягом 3 діб вважали проявом токсичної дії досліджуваного зразка. Фіксацію проводили у вечірній час (18–20 год), коли кількість мітотичних поділів максимальна, і повторювали свіжою сумішшю через 3–4 год. Загальна тривалість фіксації – 24 год. Для фіксації використовували фіксатор Кларка. На тривале збереження переносили у 70% спирт. Зафіксовані корінці використовували для виготовлення препаратів, фарбування проводили розчином ацетоорсеїну [9]. Аналіз проводили за допомогою мікроскопа Olympus XS-5520 (збільшення 10x90). Клітини аналізували на стадії анафази, коли відстань між ділянками хромосом на полюсах більша від розмірів самих хромосом, а також на стадії ранньої телофази – на початку утворення фрагмопласту [10, 11]. Основними типами аберацій, які виявляли ана-телофазним методом, були делеції і транслокації.

### Результати і їхнє обговорення

Проведено дослідження добових і збільшених у 10 разів доз харчових ароматизаторів трьох фірм виробників на індукування хромосомних аберацій у меристемних клітинах корінців *A. cepa* (табл. 1, рис. 1).

Ароматизатор «Шоколад» фірми «Акрас» спричиняв зростання рівня хромосомних аберацій, індукував переважно хромосомні та хроматидні розриви. У контролі частота виникнення мутацій становила  $1,69\pm 0,68\%$ . При пророщенні насіння на розчині харчового ароматизатора «Шоколад», що відповідає добовій дозі, відсоток аберацій становив  $1,18\pm 0,52\%$ , а при добовій дозі, збільшеній у 10 разів, –  $2,42\pm 0,72\%$  (табл. 1).

Максимальна досліджувана доза харчового ароматизатора «Шоколад» фірми «Etol» проявила гострий токсичний ефект на проростання насінин цибулі. Інші концентрації тестованої речовини спричиняли появу хромосомних аберацій різних типів: хромосомних і хроматидних фрагментів, мостів. Відсоток аномалій становив  $3,37 \pm 0,89\%$  для добової дози, що більш ніж удвічі вище за показники контролю (табл. 1).

Ароматизатор «Темний шоколад» фірми «Givaudan» проявив менший мутагенний ефект, порівняно з ароматизаторами, які описані вище. Добова доза даного ароматизатора токсичного ефекту не спричиняла, що ж стосується дози, більшої у 10 разів від добової, то проявилася слабка мутагенна дія порівняно з контролем. Хімічні компоненти даного ароматизатора індукували переважно поодинокі розриви хромосом.

Таблиця 1

Індукування хромосомних аберацій ароматизаторами «Шоколад» різних фірм в ана-телофазному тесті на *A. cerea*

Зразок	Досліджувана концентрація, г/кг	Всього ана-телофаз	Кількість аномальних ана-телофаз					Частота, $M \pm m$	t	p
			I	II	[	]	інші			
«Шоколад»	0,08	425	4	4	–	1	–	$1,18 \pm 0,52$	0,59	$P > 0,05$
«Акгас»	0,8	455	6	3	2	–	–	$2,42 \pm 0,72$	0,74	$P > 0,05$
«Шоколад»	0,04	415	3	5	3	2	1	$3,37 \pm 0,89$	1,50	$P > 0,05$
«Etol»	0,4	–	–	–	–	–	–	–	–	–
«Темний шоколад»	0,02	388	3	2	–	1	1	$1,80 \pm 0,68$	0,11	$P > 0,05$
«Givaudan»	0,2	395	5	2	1	–	1	$2,28 \pm 0,75$	0,58	$P > 0,05$
Контроль		355	3	2	1	–	–	$1,69 \pm 0,68$		

**Примітка.** I – одинарний фрагмент; II – подвійний фрагмент; [ – одинарний (хроматидний) міст; ] – подвійний (хромосомний) міст. \*Доза 0,4 г/кг виявилася токсичною для *A. cerea*.

На наступному етапі роботи ми проаналізували індукування домінуючих летальних мутацій у *Drosophila melanogaster* за дії різних концентрацій ароматизаторів трьох фірм-виробників (табл. 2). При дослідженні харчового ароматизатора «Шоколад» фірми «Акгас» виявили найвищі показники ДЛМ. Відсоток яєць із ранніми ДЛМ при дослідженні добової дози ароматизатора «Шоколад» становив  $6,87 \pm 0,56$ , дози, збільшеної у 10 разів, –  $7,39 \pm 1,76$ , що на 2–3% вище за показники контролю ( $4,18 \pm 0,40$ ). Відсоток незапліднених яєць при добовій дозі становив  $5,78 \pm 0,29$ , при збільшеній у 10 разів –  $6,07 \pm 0,72$ , що удвічі вище від контрольних даних ( $3,18 \pm 1,58$ ).

Результати, отримані при дослідженні ароматизатора «Шоколад» фірми «Etol», також показали збільшення частоти домінуючих летальних мутацій, порівнюючи з контролем. При дослідженні добової дози спостерігали збільшення незапліднених яєць більш, ніж удвічі ( $7,07 \pm 1,68$ ), порівняно з контрольними показниками ( $3,18 \pm 1,58$ ). Доза збільшена в 10 разів від добової індукувала збільшення відсотка яєць із ранніми ДЛМ ( $6,30 \pm 0,85$ ) порівняно з контролем ( $4,18 \pm 0,40$ ). Загальна частота ДЛМ для добової дози та збільшеної в 10 разів дози становила відповідно  $7,01 \pm 1,52\%$  та  $7,13 \pm 0,83\%$ , що приблизно на 2% вище від показників контролю.

За дії ароматизатора «Темний шоколад» фірми «Givaudan» не спостерігали значного підвищення рівня виникнення ранніх і пізніх домінуючих летальних мутацій у дрозофіли, однак відсоток незапліднених яєць трохи перевищував контрольні показники. Частота ДЛМ для всіх досліджуваних випадків незначно перевищувала спонтанний рівень ( $6,85 \pm 0,77\%$  і  $6,91 \pm 0,64\%$  для добової дози та збільшеної в 10 разів відповідно).

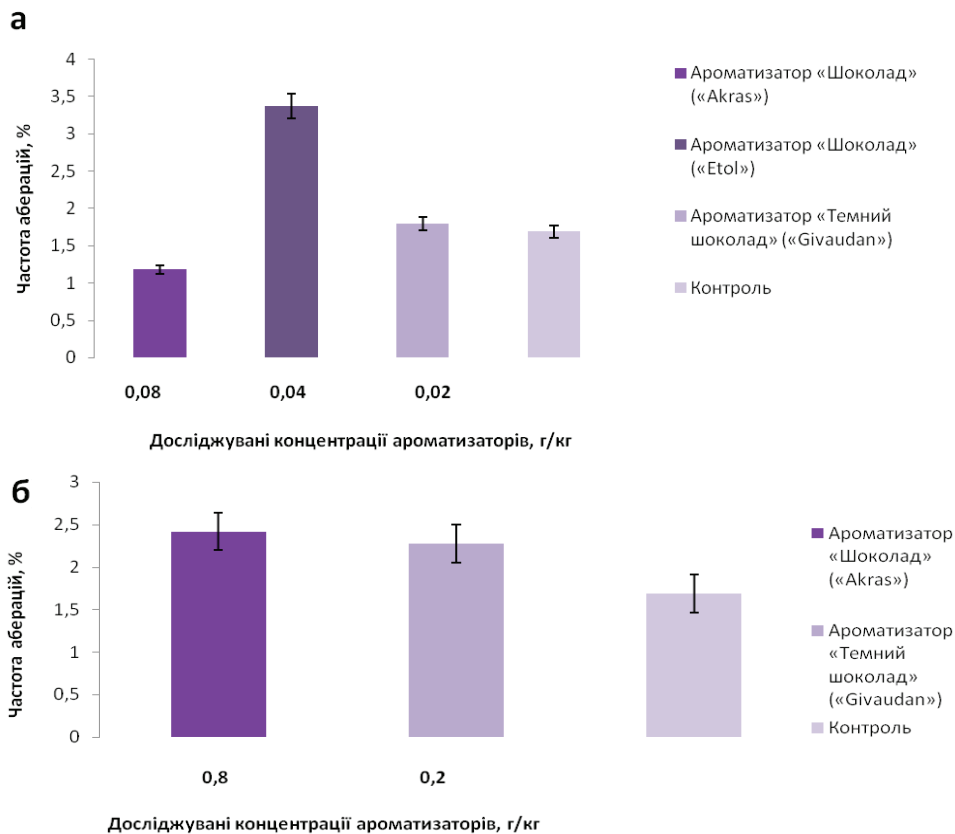


Рис. 1. Частота виникнення мутацій, індукованих харчовими ароматизаторами «Шоколад» фірм «Аkras» та «Etol» і «Темний шоколад» фірми «Givaudan» в ана-телофазному тесті на *A. cerea*: а – добова доза; б – доза, збільшена в 10 разів від добової.

Таблиця 2

Індукування домінуючих летальних мутацій у *Drosophila melanogaster* ароматизаторами «Шоколад» різних фірм-виробників

Зразок	Досліджуванa концентрація, г/кг	Кількість відкладених яєць	Відсоток незапліднених яєць, %	Відсоток яєць із ранніми ДЛМ, %	Відсоток яєць із пізніми ДЛМ, %	Частота ДЛМ, %	t	p
«Аkras»	0,08	1242	5,78±0,29	6,87±0,56	0,65±0,25	8,19±0,83	2,67	P<0,05
«Шоколад»	0,8	1293	6,07±0,72	7,39±1,76	1,35±0,29	9,11±1,52	2,34	P<0,05
«Etol»	0,04	1229	7,07±1,68	5,37±2,38	1,13±0,29	7,01±1,52	2,59	P<0,05
«Шоколад»	0,4	1158	5,52±0,25	6,30±0,85	0,43±0,25	7,13±0,83	3,65	P<0,05
«Givaudan»	0,02	1247	4,72±0,54	5,81±0,87	0,35±0,65	6,85±0,77	2,63	P<0,05
«Темний шоколад»	0,2	1231	6,75±0,76	4,21±0,88	1,05±0,42	6,91±0,64	2,44	P<0,05
Контроль		1267	3,18±1,58	4,18±0,40	1,26±0,57	5,58±0,80		

Таким чином, нами були отримані результати і проведений аналіз щодо індукування хромосомних аберацій у меристемних клітинах *A. cerea* та домінуючих летальних мутацій на *D. melanogaster* ароматизаторами «Шоколад» різних фірм-виробників. При дослі-

дженні впливу ароматизаторів на індукування хромосомних аберацій на рослинній тест-системі саме ароматизатор «Шоколад» фірми «Etol» показав найвищий рівень мутагенної активності, збільшення частоти делецій і транслокацій на 2% порівняно з контролем. Із літературних даних відомо, що масляна кислота, діацетил, диметилгіоксаль, етилбутират є алкільними сполуками та можуть викликати мутації як на рівні генів, так і на рівні хромосом. Алкільюючі агенти здатні вибірково взаємодіяти з атомами нітрогену (найчастіше в молекулі гуаніну), що може викликати збільшення кількості помилок за комплементарного сполучення азотистих основ. Такі передмутаційні зміни можуть призвести до виникнення мутацій типу заміни пар основ. Якщо сполука містить багато алкільних груп, що стосується і складових ароматизатора «Шоколад», то вона може спричинити появу поперечних зшивок ланцюгів ДНК, що в подальшому в процесі реплікації призводить до розривів ниток ДНК. За хімічною структурою дигідрокумарин в основі має бензолні кільця, тому теоретично може інтеркалювати між азотистими основами, що в подальшому спричинить мутацію типу зсуву рамки зчитування. На жаль, залишається невідомою кількісна характеристика складових ароматизатора «Шоколад» фірми «Etol». Крім переліку хімічних сполук, немає жодних даних про їх кількість в одиниці ароматизатора, що надзвичайно важливо при вивченні хімічного мутагенезу. Відкритим залишається також питання біо-трансформації хімічних сполук, що є складовими ароматизаторів. Відомо, що ксенобіотики, які потрапляють в організм людини, окислюються оксидазами зі змішаними функціями шляхом епоксидування подвійних зв'язків, гідроксилуванням, деалкілюванням та ін., у зв'язку з чим можуть виникати активні метаболіти з ще більш вираженою мутагенною чи канцерогенною активністю.

За дії ароматизатора «Шоколад» фірми «Akras» зафіксовано найвищі показники індукування домінантних летальних мутацій у *D. melanogaster* ( $9,11 \pm 1,52$ ). Оскільки в досліді ароматизаторами харчувалися тільки самці (самки перебували на звичайному поживному середовищі), скоріше за все, хімічні складові даного ароматизатора мають здатність впливати на проходження сперматогенезу: або блокувати утворення нормальних статевих клітин на певних етапах гаметогенезу, в тому числі сперматозоїдів, або ж змінювати їхню здатність до запліднення. Ароматизатор фірми «Etol» також індукував збільшення кількості яєць із ранніми домінантними летальними мутаціями, проте у відсотковому співвідношенні ці показники були меншими і становили для добової дози  $5,37 \pm 2,38\%$ , а при збільшеній у 10 разів дозі –  $6,30 \pm 0,85\%$  (контроль –  $4,18 \pm 0,40\%$ ). Для ароматизатора «Темний шоколад» фірми «Givaudan» процентне співвідношення частоти домінантних летальних мутацій достовірно не відрізнялося від контролю.

Виходячи з порівняльної характеристики генотоксичної активності різних доз ароматизаторів «Шоколад» трьох фірм потужних європейських виробників, ми виявили, що найбільш безпечним щодо мутагенного навантаження на геном людини є використання ароматизаторів швейцарської фірми «Givaudan», яка для виготовлення своєї продукції використовує переважно натуральну сировину. Проте, з токсикологічної точки зору, харчові добавки навіть природного походження не можна вважати абсолютно нешкідливими для здоров'я людей, адже більшість відомих на сьогодні токсичних речовин мають саме природне походження.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Булдаков А. С. Пищевые добавки: справочник. СПб.: Северо-Запад, 1996. С. 240–241.
2. Григорьева Р. З. Безопасность продовольственного сырья и продуктов питания: учеб. пособие. Кемерово: Терра, 2004. С. 86–88.

3. Дурнев А. Д., Середенин С. Б. Мутагены (скрининг и фармакологическая профилактика воздействий). М.: Медицина, 1998. 328 с.
4. Дурнев А. Д., Орещенко А. В., Сариивили Н. Г. Продукты питания и индуцированный мутагенез: обзор // Хранение и переработка сельхозсырья. 1995. № 5. С. 21–23.
5. Дурнев А. Д. Мутагены и антимутагены в продуктах питания // Генетика. 1997. Т. 33. № 2. С. 165–176.
6. Медведев Н. Н. Практическая генетика. М.: Наука, 1968. 294 с.
7. Нейман И. М. Канцерогены и пищевые продукты. М.: Медицина, 1972. 152 с.
8. Орещенко А. В., Беристель И. Ф. О пищевых добавках в продуктах питания // Пищевая промышленность. М.: Просвещение, 1996. С. 4–6.
9. Прохорова И. М., Ковалева М. И., Фомичева А. Н. Оценка митотоксического и мутагенного действия факторов окружающей среды: метод. указания. Ярославль: Яросл. гос. ун-т, 2003. 32 с.
10. Рожнов Г. И., Проинова В. А., Лиманцев А. В. и др. Разработка альтернативных методов оценки токсичности химических веществ на основе биотестирования // Токсикол. вестн. 1995. № 6. С. 27–29.
11. Смирнов В. Г. Цитогенетика. М.: Высшая школа, 1991. 247 с.
12. Смоляр В. І. Токсичні ефекти харчових добавок // Проблеми харчування. 2005. № 1. С. 10–15.
13. Скурихин И.М., Нечаев А. П. Все о пище с точки зрения химика: справ. издание. М.: Высшая школа, 1991. 288 с.
14. Стрижельчик Н. Г., Бариляк И. Р. Мутагенные и антимутагенные свойства пищевых добавок. Харьков: ХНУ им. Каразина, 2009. 152 с.

Стаття: надійшла до редакції 30.09.13

доопрацьована 04.11.13

прийнята до друку 05.11.13

## COMPARATIVE DESCRIPTION OF FOOD FLAVOURS OF DIFFERENT PRODUCERS IN RELATION TO MUTAGENE ACTIVITY

I. Bodnar, O. Ilkov, S. Gorbulinska, L. Bodnar

*Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: bodivas@gmail.com*

Mutagenic activity of the samples of natural-identical food flavors “Chocolate” produced by companies «Etol» and «Akras» and “Dark Chocolate” by company «Givaudan» were investigated. Flavour “Chocolate” by company «Etol» in *Allium cepa*-test showed toxic effects, caused the appearance of various types chromosomal aberrations chromatid and chromosomal fragments and showed an increase in the number of unfertilized eggs and doubling the frequency of dominant lethal mutations compared with the control in *Drosophila melanogaster*. Mutagenic effect of flavor «Chocolate» by company «Akras» found only in the dose increased in 10 times of daily, revealed the highest frequency of lethal mutations and increase the number of unfertilized eggs. Flavour «Dark Chocolate» by company «Givaudan» showed the lowest mutagenic effect on both test systems, compared with flavorings other companies wich described above.

*Keywords:* food flavorings, dominant lethal mutation, anaphase-telophase genotoxicity assay, chromosomal aberration.

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПИЩЕВЫХ АРОМАТИЗАТОРОВ РАЗНЫХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ОТНОСИТЕЛЬНО МУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ

И. Боднар, О. Ільков, С. Горбулинская, Л. Боднар

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: bodivas@gmail.com*

Исследована мутагенная активность образцов натурально-идентичных пищевых ароматизаторов «Шоколад» фирм «Etol» и «Акрас» и «Темный шоколад» фирмы «Givaudan». Ароматизатор «Шоколад» фирмы «Etol» в ана-телофазном тесте на *Allium cepa* проявил токсический эффект, вызывал появление хромосомных aberrаций разных типов – хромосомных и хроматидных фрагментов, дицентриков, а также показал увеличение количества неоплодотворенных яиц и увеличение в два раза частоты доминантных летальных мутаций по сравнению с контролем на *Drosophila melanogaster*. Самые высокие показатели частоты доминантных летальных мутаций, а также увеличение количества неоплодотворенных яиц проявил ароматизатор «Шоколад» фирмы «Акрас» в дозе, в 10 раз превышающей суточную. Ароматизатор «Темный шоколад» фирмы «Givaudan» проявил самый низкий мутагенный эффект на двух тест-системах, по сравнению с ароматизаторами других фирм, описанных выше.

*Ключевые слова:* ароматизаторы продуктов питания, доминантные летальные мутации, ана-телофазный анализ, хромосомные aberrации.