

На правах рукописи

ФОМИНА ТАТЬЯНА АЛЕКСЕЕВНА

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИДОВОЙ
ПРИНАДЛЕЖНОСТИ МЯСНЫХ И РАСТИТЕЛЬНЫХ
ИНГРЕДИЕНТОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ
ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Специальность 05.18.04 - Технология мясных, молочных и
рыбных продуктов и холодильных
производств

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Москва – 2012

Работа выполнена в Государственном научном учреждении Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности им. В.М. Горбатова Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИИМП им. В.М. Горбатова Россельхозакадемии)

Научный руководитель: доктор технических наук,
Хвьяля Сергей Игоревич

Официальные оппоненты: Дибирасулаев Магомед Абдулмаликович,
доктор технических наук, ГНУ ВНИХИ
Россельхозакадемии, заведующий
отделом холодильной технологии
пищевых продуктов

Трифонов Михаил Валерьевич, кандидат
технических наук, ГНУ ВНИИМП им.
В.М. Горбатова Россельхозакадемии,
заместитель заведующего отделом
маркетинга


Ведущая организация: ГНУ ВНИИ птицеперерабатывающей
промышленности
Россельхозакадемии

Защита диссертации состоится « 22 » мая 2012 г. в 14³⁰ часов на заседании Диссертационного совета ДМ 006.021.01 при ГНУ ВНИИМП им. В.М. Горбатова Россельхозакадемии по адресу: 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ ВНИИМП им. В.М. Горбатова Россельхозакадемии по адресу: 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат технических наук,
старший научный сотрудник



Захаров
Александр Николаевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Важное место в оценке качества мясных продуктов занимает контроль за соблюдением научно обоснованных рецептур и определения сырьевого состава готовых мясopодуKтов. Известно, что ГОСТы и ТУ определяют показатели, нормы и требования к качеству сырья и готовой продукции. В нормативной документации, разработанной и утвержденной на каждый вид мясной продукции, прописывается состав используемого сырья и его соотношения. Ряд Федеральных законов обязывает изготовителей данной продукции выполнять заданные требования. Выпуская пищевой продукт, не соответствующий требованиям нормативных документов, и на этикетках которого нет данных о добавлении или замене тех или иных ингредиентов, производитель часто нарушает закон РФ «О качестве и безопасности пищевых продуктов» (02.01.2002), в котором указано, что такая продукция является некачественной и небезопасной.

На данный момент используемые методы органолептического, физико-химического и микробиологического контроля дают возможность определить свежесть и безопасность конкретной партии мясного сырья и готовых мясных изделий. Гистологический анализ в ряде случаев позволяет выявить использование субпродуктов, соевых белковых и углеводных добавок. Но с помощью данных методов нельзя решить не менее важную задачу, возникающую в практике определения качества мясной продукции - установление видовой принадлежности мясных и растительных ингредиентов.

Исходя из этого, необходимо разработать объективный метод идентификации видовой принадлежности мяса, мясных и растительных ингредиентов, в том числе входящих в состав готовых мясных продуктов. Наиболее перспективным для решения данной задачи является метод, основанный на ДНК-диагностике, а именно метод полимеразной цепной реакции с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени (ПЦР в реальном времени).

Вопросами применения ПЦР для идентификации сырьевого состава посвящены работы как отечественных, так и зарубежных авторов, таких как: Комаров А.Б., Анисимова О.В., Галкин А.В., Lopez-Andreo M., Binke R., Schwägele F., Müller E., и т.д. Однако проведенных исследований по возможностям применения данного метода к продуктам различной технологии производства было не много.

В связи с вышеизложенным, крайне важным и актуальным становятся разработка метода соответствующего передовому уровню в науке и технике.

Целью диссертации являлась разработка метода идентификации видовой принадлежности мяса, мясных и растительных ингредиентов, в том числе в составе пищевых продуктов, вне зависимости от технологии их производства, на основе ПЦР в реальном времени.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать метод на основе ПЦР в реальном времени для идентификации по ДНК биологического материала, принадлежащего КРС, свинье, курице, индейке и сое.

2. Провести оценку диагностической способности разработанного метода идентификации.

3. Определить лимитирующие факторы применения разработанного метода идентификации.

4. Провести анализ практических возможностей применения разработанного метода.

5. Разработать нормативную документацию на метод идентификации сырьевого состава мясной продукции.

6. Рассчитать экономическую эффективность применения разработанного метода идентификации.

Научная новизна работы. Определены консервативные участки последовательности генов митохондриальной ДНК следующих биологических объектов: род Настоящие быки (лат. *Bos*) вид Дикий бык (лат. *Bos taurus*) подвид Домашний бык (лат. *Bos taurus taurus*) и подвид Зебу (лат. *Bos taurus indicus*); род Кабаны (лат. *Sus*) вид Кабан, или Дикая свинья (лат. *Sus scrofa*) подвид Домашняя свинья (лат. *Sus scrofa domesticus*); род Гребенчатые куры (лат. *Gallus*) вид Банкивский петух (лат. *Gallus gallus*) подвид Домашняя курица (лат. *Gallus gallus domesticus*); род Индейки (лат. *Meleagris*) вид Индейка (лат. *Meleagris gallopavo*); род Соя (лат. *Glycine*) вид Соя культурная (лат. *Glycine max*) с различной разрешающей возможностью, что позволяет конструировать на их основе различные тест-наборы с идентификацией до рода, вида или подвида.

Научно обоснована и экспериментально доказана высокая эффективность применения разработанного метода на основе ПЦР в реальном времени для ускоренной идентификации биологического материала, принадлежащего КРС, свинье, сельскохозяйственной птице и сое, в составе сырья, полуфабрикатов и готовых продуктов питания.

Доказано, что разработанный метод на основе ПЦР в реальном времени позволяет идентифицировать видовое происхождение сырья в составе продуктов, подвергнутых, в ходе их выработки, различным физическим, химическим и механическим воздействиям.

Практическая значимость. Разработан и внедрен в лабораторную практику метод идентификации видового состава мясных продуктов на основе ПЦР в реальном времени, отличающийся низким пределом обнаружения, так как необходимый биологический объект может быть достоверно обнаружен при наличии не менее 20 копий его специфической ДНК в анализируемой пробе ДНК. К преимуществам данного метода относятся идентификация по ДНК, которая является высокоустойчивым к различным физическим, химическим и механическим воздействиям материалом, что делает его универсальным по отношению к продуктам, выработанным по различным технологиям.

Разработан метод на основе ПЦР в реальном времени, не имеющий аналогов среди методов, применяемых в мясной промышленности для контроля качества продукции.

Разработаны:

- ГОСТ Р 52 723-2007 Продукты пищевые и корма «Экспресс-метод определения сырьевого состава (молекулярный)». Стандарт введен в действие с 01.06.2008 г.

- Методические рекомендации МР 4.2.0019-11 Методы контроля. Биологические факторы. «Идентификация сырьевого состава мясной продукции». МР введены в действие с 18.04.2011 г.

По данной нормативной документации работают Испытательный центр «ВНИИМП им. В.М. Горбатова», ООО «Биоком», Институт питания РАМН, городская ветеринарная лаборатория «ГВЛ», лаборатория ОПВК ЗАО «Микояновский мясокомбинат» и др.

Апробация работы. Результаты выполненных исследований были представлены на IV ММК «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (г. Москва, 2007 г.); Конференции-конкурсе научно-инновационных работ молодых ученых и специалистов «Отделения хранения и переработки сельскохозяйственной продукции» (г. Москва, 2007 г.); НПК «Интеграция фундаментальных и прикладных исследований – основа развития современных аграрно-пищевых технологий» (г. Углич, 2007 г.); 11-ой МНПК памяти В.М. Горбатова (г. Москва, 2008 г.); Конференции-конкурсе научно-инновационных работ молодых ученых и специалистов «Отделения хранения и переработки сельскохозяйственной продукции» (г. Москва, 2008 г.); VII МНК студентов и молодых ученых (г. Москва, 2008 г.); 12-ой МНК памяти В.М. Горбатова (Москва 2009 г.); Конференции-конкурсе «Инновационные технологии – основа модернизации отраслей производства и переработки сельскохозяйственной продукции» (Волгоград, 2011 г.); 56-ой МК «Мясо и мясопродукты, безопасность, культура, развитие, качество жизни» (Тара, Сербия, 2011 г.); 57-ом Международном конгрессе по вопросам

науки и технологии мяса (Генте, Бельгия, 2011 г.); МНТК «Биотехнологические системы в производстве пищевого сырья и продуктов: инновационный потенциал и перспективы развития» (Воронеж, 2011 г.).

Публикации: По результатам исследования было опубликовано 17 печатных работ, в том числе в изданиях рекомендованных ВАК - 3.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа включает введение, обзор научно-технической литературы, характеристику объектов и методы исследования, результаты исследования и их анализ, выводы, список источников использованной литературы и приложения. Содержание работы изложено на 126 страницах машинописного текста, содержит 50 рисунков, 17 таблиц и 4 приложения. Библиография включает 145 источников, в том числе 59 зарубежных авторов.

ОРГАНИЗАЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В соответствии с целью и задачами работы объектами исследования являлись:

- Геном:

КРС – род Настоящие быки (лат. *Bos*) вид Дикий бык (лат. *Bos taurus*) подвид Домашний бык (лат. *Bos taurus taurus*) и подвид Зебу (лат. *Bos taurus indicus*);

свиней – род Кабаны (лат. *Sus*) вид Кабан, или Дикая свинья (*Sus scrofa*) подвид Домашняя свинья (лат. *Sus scrofa domesticus*);

кур – род Гребенчатые куры (лат. *Gallus*) вид Банкивский петух (лат. *Gallus gallus*) подвид Домашняя курица (лат. *Gallus gallus domesticus*);

индейки – род Индейки (лат. *Meleagris*) вид Индейка (лат. *Meleagris gallopavo*);

сои – род Соя (лат. *Glycine*) вид Соя культурная (лат. *Glycine max*).

- Биологический материал, содержащий ДНК КРС, свиньи, курицы, индейки.

- Растительное сырье: соя различной технологической переработки.

- Мясные, мясосодержащие и мясорастительные продукты.

Проведение исследований осуществлялось в несколько этапов в соответствии со схемой, представленной на рис. 1.



Рис. 1. Схема проведения исследований

Экспериментальные исследования проводили в условиях лаборатории гигиены производства и микробиологии ГНУ ВНИИМП им. В.М. Горбатова Россельхозакадемии.

Детальный анализ митохондриальной и ядерной ДНК изучаемых биологических объектов и поиск их нуклеотидных последовательностей проводили по генетической базе Национального центра биотехнологической информации США (NCBI).

Анализ выбранных нуклеотидных последовательностей на вариабельность и поиск консервативных участков, необходимых для выбора праймеров проводили с помощью компьютерных программ CLC Sequence Viewer и Primer Express 2 (Applied Biosystems). Специфичность выбранных праймеров теоретически изучали с помощью интерактивной системы BLAST on-line.

Выбранные праймеры были синтезированы ЗАО «Синтол» на синтезаторе ASM-102.

Экстракцию ДНК проводили коммерческим набором реагентов «Сорб-ГМО» ЗАО «Синтол». В основе метода лежала экстракция и очистка ДНК с помощью ионного детергента цетилтриметиламмония бромида (ЦТАБ) с последующим сорбированием на носитель. Также

экстракцию ДНК осуществляли с использованием полуавтоматической станции ABI Prism® 6100 Nucleic Acid Prep Station.

ПЦР проводили на приборе с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени - ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, США), по следующей программе: 95 °С – 420 с, 1 цикл; 95 °С – 15 с, 55-65 °С – 30-60 с, 40 циклов. Амплификацию проводили в реакционном буфере объемом 30 мкл следующего состава: каждого праймера по 100-200 нМ, 2,5х реакционной смеси с концентрацией солей 57 мМ, MgCl₂ 25 мМ, деионизованную воду и в качестве матрицы (ДНК-пробы) 2 мкл экстракта ДНК. Эффективную концентрацию праймеров и температуру отжига подбирали в ходе работы.

Изучение микроструктурных препаратов проводили по ГОСТ 51604-2000.

При проведении лабораторных исследований строго соблюдали требования к организации работы в лаборатории, использующейся для проведения исследований метод ПЦР в режиме реального времени. Достоверность всех полученных результатов подтверждали 3-х кратной повторностью экспериментов, а также статистической обработкой результатов экспериментальных исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Разработка метода на основе ПЦР в реальном времени

На основе данных научно-технической литературы и собственных исследований в качестве ДНК-сиквенса была выбрана митохондриальная ДНК (мтДНК) животных и птиц и ядерная ДНК (ядДНК) растений. Основанием в пользу мтДНК служила, во-первых, ее многокопийность: количество копий мтДНК составляет 1000-8000 копий на клетку, превышая тем самым количество копий ядерной ДНК в несколько раз. Во-вторых, выраженная изменчивость мтДНК, скорость эволюции которой превышает таковую для яДНК в 10-20 раз, обеспечивая тем самым внутри- и межвидовой полиморфизм.

При помощи базы данных NCBI был проведен детальный анализ более 2000 вариантов сиквенса мтДНК различных пород подвида Домашний бык, подвида Зебу, вида Гаур, вида Бантенг, вида Як, вида Азиатский буйвол и подвида Свинья домашняя.

В результате анализа в качестве перспективной матрицы для дизайна олигонуклеотидных праймеров специфичных к ДНК КРС и свиньи был выбран ген СУТЬ. Данный ген имел наименьшие внутривидовые расхождения, дивергенция составляла не более 1 %.

По итогам анализа мтДНК сельскохозяйственной птицы, а именно 300 вариантов сиквенса мтДНК Домашней курицы и индейки, было

установлено, что оптимальной мишенью для дизайна праймеров специфичных к сельскохозяйственной птице будет участок на стыке двух генов, ND5 и СУТb. Связано это с расхождением в последовательности расположения генов мтДНК птиц и млекопитающих.

В результате изучения яДНК растений в качестве мишени для дизайна праймеров видоспецифичных к сое был определен ген лектина, участок Le1, так как он обладал наименьшей степенью полиморфизма и абсолютной внутривидовой сходимостью.

В результате обработки выбранных генов-мишеней компьютерной программой Primer Express 2 были выбраны оптимальные для целей идентификации видовой принадлежности мяса, мясных и растительных ингредиентов в составе пищевых продуктов.

Теоретически специфичность выбранных олигонуклеотидов была проверена в режиме on-line при помощи компьютерной программы BLAST и составила 99 %. Данная проверка подтвердила гомологию выбранных праймеров с нуклеотидными последовательностями генов-мишеней изучаемых биологических объектов и отсутствия значимой гомологии с нуклеотидными последовательностями генов других видов животных, птиц и растений.

Структура каждого праймера удовлетворяла общепринятым правилам: отсутствие самокомплементарности 3'-концов каждого олигонуклеотида, отсутствие комплементарности 3'-концов прямых и обратных праймеров, отсутствие вторичных структур, отсутствие тугоплавких повторов (более 3-х GC) на 3'-конце каждого праймера, отсутствие многократных AT (или GC)-повторов внутри каждого праймера.

Для оптимизации условий амплификации использовали праймеры с молярной концентрацией от 50 до 200 нМ, температура плавления которых была в пределах 59-64 °С.

Оценку эффективной концентрации праймеров в реакционной смеси проводили в несколько этапов. На каждом этапе работы концентрация одного из праймеров варьировала, в то время как концентрация другого оставалась постоянной. По итогам данного эксперимента концентрации праймеров были определены, исходя из результатов стадии диссоциации.

Далее были отработаны концентрации зондов, в этом случае учет проводили по степени флуоресценции и эффективности отжига зондов. Так же как и на предыдущих этапах, были составлены растворы, имеющие разные концентрации зонда в диапазоне 50-100 нМ, смесь форвард и реверс праймеров имела постоянную концентрацию.

Эффективность амплификации при разных температурах отжига изучали отдельно для каждой пары праймеров. Варьирование температуры отжига праймеров в диапазоне от 58 до 60 °С не оказывало влияния на чувствительность теста, в то время как увеличение температуры отжига до 62 °С уменьшало чувствительность амплификации. При температуре отжига менее 58 °С во многих случаях наблюдались неспецифические фрагменты. В результате проведенных экспериментов были определены оптимальные параметры амплификации, при которой успешно работают все сконструированные праймеры.

С целью контроля работы амплификационной системы была составлена панель эталонных образцов ДНК, экстрагированных из биологического материала российских пород группы КРС и свиней, предоставленного ГУ ВНИТИ мясо-молочного скотоводства и переработки продукции животноводства Россельхозакадемии. Также в контрольную панель входили образцы ДНК, экстрагированные из биоматериала видовой коллекции ГНУ ВНИИ мясной промышленности им. В.М. Горбатова Россельхозакадемии.

По окончании анализа теоретической специфичности выбранных праймеров, определению оптимальных условий амплификации и подготовке эталонных контролей были собраны 4 набора реагентов для ПЦР в реальном времени, содержащих видоспецифичные праймеры для идентификации ДНК исследуемых биологических объектов (табл. 1).

Таблица 1

Наборы для идентификации видовой принадлежности

НАЗВАНИЕ НАБОРА	ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ
«mtBOSi»	Для обнаружения в одной пробирке ДНК специфичной для животных группы КРС (Домашний бык, Зебу, Гаур)
«mtSUSi»	Для обнаружения в одной пробирке ДНК специфичной для подвида Домашняя свинья (европейский и азиатский тип)
«mtGAL/MELi»	Для обнаружения в одной пробирке ДНК специфичной для видов Домашняя курица и Домашняя индейка
«gSOYi»	Для обнаружения в одной пробирке ДНК специфичной для вида Соя культурная

К наборам были сформированы инструкции и алгоритм исследования разработанным методом с описанием всех этапов анализа, таких как: подготовка проб к анализу, выделение ДНК, проведение амплификации в режиме реального времени и флуоресцентная детекция.

Оценка диагностической способности разработанного метода идентификации на основе ПЦР в реальном времени

Оценку специфичности метода идентификации проводили в два этапа. На первом была протестирована эталонная панель образцов ДНК. Результаты, полученные в ходе проведения эксперимента, показали, что амплификация с гетерологичными ДНК-матрицами, а также с пустой пробой, давала отрицательный результат до 35 цикла амплификации. После 35 цикла в некоторых случаях появлялись сигналы флуоресценции неспецифического отжига, в связи с чем результат специфических реакций анализа учитывали до 35 цикла.

На втором этапе анализировали многокомпонентные опытные образцы. Они были подготовлены в лабораторных условиях и представляли собой фаршевую смесь с разным составом животных и растительных ингредиентов. Данный эксперимент подтверждал соответствие между теоретической заданной специфичностью праймеров и результатами лабораторного анализа. Таким образом, аналитическая специфичность наборов составляла 100 %.

Предел обнаружения метода (LOD - Limited of detection) рассчитывали путем амплификации ряда десятикратных разведений экстрактов ДНК различных эталонных образцов. В качестве примера на рис. 2 представлен результат амплификации экстракта ДНК выделенных из мышечной ткани свиньи, как положительный контроль, и экстракта ДНК в разведениях свиной шкурки, т.е. соединительной ткани с высоким содержанием жира, проводимой с использованием набора реагентов «mtSUSi».



Рис. 2. Кривые флуоресценции накопленных продуктов в результате ПЦР в реальном времени

1 – ДНК мышечной ткани, 100 %; 2 – ДНК соединительной ткани, 100 %, и ее разведения №№ 3, 4, 5, 6 соответствующие 10, 1,0, 0,1, 0,01 %; A, B – точка начала log-фазы.

Как видно из рисунка специфическая реакция (до 35 цикла) наблюдается в образцах со 100 % содержанием анализируемой специфической ДНК и в образцах с содержанием ДНК 10 и 1,0 %.

Сопоставив кинетику анализируемых образцов, заключили, что концентрация ДНК соединительной ткани с высоким содержанием жира на три порядка меньше, то есть в 1000 раз, чем в мышечной ткани. Таким образом, в пересчете процентных данных по мясу, предел обнаружения метода по мышечной ткани составлял 0,001 %, а по свиной шкурке 1,0 %, при пороге учета результатов до 35 цикла. Данный результат был подтвержден в ходе тестирования всех остальных приготовленных десятикратных разведений эталонных ДНК.

Далее было определено число копий ДНК эталонных образцов, содержащихся в 2 мкл экстракта. С этой целью были искусственно синтезированы генно-инженерные конструкции, несущие видоспецифические вставки гена лектина 1×10^6 копий на мкл и участка гена цитохрома 1×10^6 копий на мкл, данные конструкции были обозначены как калибраторы «Лектин» и «Цитохром». В результате одновременной амплификации эталонных образцов и калибраторов было установлено, что на реакцию приходится 2×10^6 копий ДНК эталонных образцов. Исходя из полученных данных, был произведен расчет количества копий ДНК в десятикратных разведениях на реакцию: 10 % - 200000; 1,0 % - 20000; 0,1 % - 2000; 0,01 % - 200; 0,001 % - 20. Таким образом, исследуемый биологический объект может быть достоверно обнаружен, при условии выделения из образца не менее 20 копий его видоспецифичной ДНК, что является LOD метода.

Проведенные исследования опытных образцов колбасных изделий, выработанных на производстве ЭККЗ ВНИИМП, с заранее заданными условиями по количеству и способу внесения соевого белка, показали, что практический предел обнаружения равен 0,001 % при добавлении сои в растворенном виде, и 0,002 % в случае внесения сои в виде порошка. Связано это, вероятнее всего, с неравномерным распределением внесенной навески соевого порошка в 100 кг фарша, что привело к отсутствию в выделенном экстракте ДНК из данного образца необходимого количества ее копий.

По итогам проведенных исследований и полученным результатам были составлены контрольные образцы к каждой тест-системе, которые позволяли, при наличии специфической реакции, дифференцировать результат как отрицательный, при случайной контаминации образца исследования, или положительный, в случае наличия выявляемого объекта в достаточном количестве. Контрольные образцы представляли собой разведенные экстракты ДНК КРС, свиньи, курицы и сои в концентрации 0,01 %. Данная концентрация была определена как пороговая путем аналитического анализа, который показал, что добавлять в продукт менее 0,01 % фальсификата не целесообразно. При этом доводы

о случайной контаминации в промышленных условиях в случае наличия 0,01 % и более какого-либо не декларированного ингредиента в составе продукта являются сомнительными, так как 0,01 % эквивалентно, например, 10 г мяса или 1 кг шкурки в 100 кг фарша. Наличие такого объема и более возможно объяснить либо несоблюдением санитарно-гигиенических мероприятий, проводимых на предприятиях, что недопустимо при производстве высококачественных пищевых продуктов, либо сознательным внесением ингредиента, не предусмотренного рецептурой.

Определение лимитирующих факторов применения метода ПЦР в реальном времени

С целью определения лимитирующих факторов использования ПЦР для видовой идентификации биологических объектов в составе готовой мясной продукции были исследованы опытные образцы, предварительно подвергнутые различным физическим, химическим и механическим воздействиям, таким как замораживание, нагревание, выдержка сырья в растворе нитрита натрия и механическое измельчение.

В результате оценки влияния режимов замораживания было установлено, что процессы замораживания незначительно влияют на степень деградации ДНК и не оказывают влияния на диагностическую способность метода идентификации (рис. 3).

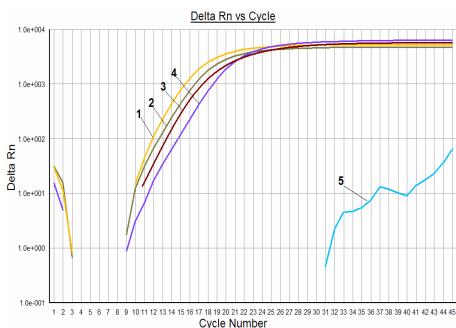


Рис. 3. Определение влияния замораживания мяса на диагностическую способность метода

1 – эталонный образец; 2 – однократное замораживание говядины при -20 °С в течение 90 суток; 3 – повторное замораживание говядины при -20 °С в течение 90 суток; 4 – однократное замораживание говядины при -20 °С в течение 5 лет; 5 – отрицательный контрольный образец.

Данные, полученные в результате амплификации ДНК, выделенной из образцов, подвергнутых нагреванию, также говорили о возможности применения разработанного метода для выявления специфической ДНК (рис. 4). Однако, потери ДНК в данных образцах, по сравнению с образцами, подвергнутых замораживанию, несколько большие, деградация была, приблизительно в 10 раз больше.

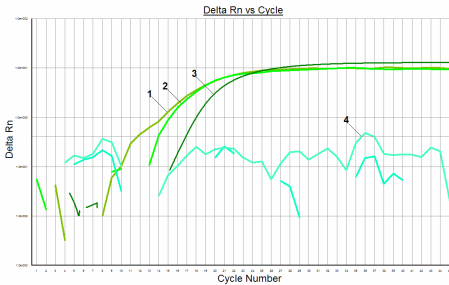


Рис. 4. Определение влияния режимов обработки сырья высокими температурами на диагностическую способность метода

1 – эталонный образец; 2 – вареная говядина при 72 °С в течении 25 минут; 3 – говядина обработанная при 121 °С в течении 50 минут (автоклавирование); 4 – отрицательный контрольный образец.

По итогам амплификации ДНК, выделенной из образца фарша прошедшего стадию посола с добавлением нитрита натрия и образца с гнилостными изменениями, деградации ДНК, оказывавшую влияние на чувствительность и специфичность разработанного метода, выявлено не было (рис. 5).

Следует отметить, что все опытные образцы были гомогенизированы. Тем самым было подтверждено, что механическое измельчение мяса также не влияет на чувствительность и специфичность метода.

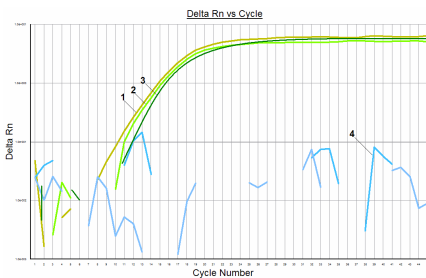


Рис. 5. Определение влияния посола мяса и гнилостные изменения мяса на диагностическую способность метода

1 – эталонный образец; 2 – говядина, выдержанная в растворе нитрита натрия в течение 1 суток; 3 – говядина, выдержанная при 22-24 °С в течение 2 суток (мясо с гнилостными изменениями).

Таким образом, результаты проведенных комплексных исследований показывают, что метод идентификации на основе ПЦР в реальном времени может применяться для определения видовой принадлежности мяса, мясных и растительных ингредиентов, в том числе в составе пищевых продуктов, вне зависимости от технологии их производства.

Определение возможности идентификации животных белков

Благодаря химическому составу и функциональным свойствам животные белки являются альтернативой соевым изолированным белкам

и могут использоваться при производстве мясных продуктов с целью замены мяса. Для определения возможности выявления такого рода фальсификации методом ПЦР были проанализированы наиболее используемые при производстве мясных изделий животные белки, такие как сухая кровь, плазма крови и коллагенсодержащие белки, а также белки на основе молочной сыворотки и сухое молоко.

По результатам анализа образцов свиной плазмы крови и сухой крови заключили, что ДНК возможно экстрагировать как из сухой крови так и из плазмы, не содержащей форменные элементы. Однако плазма крови содержит единичные копии ДНК и в случае внесения такого животного белка в состав, например, колбасного изделия, идентифицировать его методом ПЦР будет невозможно. Сухая кровь содержит достаточное количество ДНК, такой белок будет идентифицирован при внесении его с целью фальсификации (рис. 6).

Коллагенсодержащие препараты также содержат достаточное для идентификации количество ДНК и в случае необходимости могут быть выявлены как фальсифицирующие добавки (рис. 7).

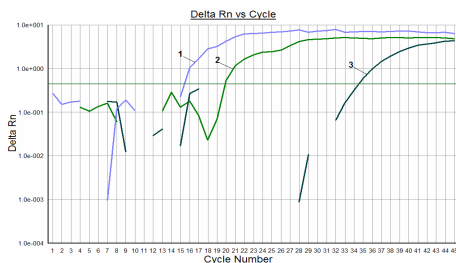


Рис. 6. Идентификация животных белков
1 – Эталонный образец; 2 – свиная сухая кровь; 3 – свиная плазма крови.

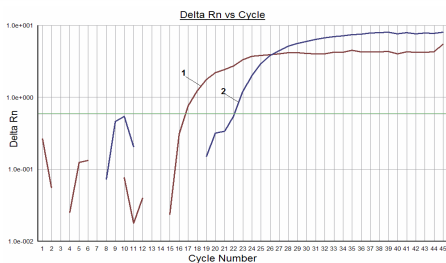


Рис. 7. Идентификация животных белков
1 – Эталонный образец; 2 – коллагенсодержащий белок.

Анализ образцов белка на основе молочной сыворотки и сухого молока показал, что в сухом молоке содержание ДНК эквивалентно приблизительно 1,0 % раствора разведенной ДНК мышечной ткани КРС, специфический отжиг праймеров начинается на 22-23 цикле. ДНК в образце белка на основе молочной сыворотки содержится меньше, точка начала логарифмического роста заметна только на 31 цикле. Из того и

другого образца возможно экстрагировать ДНК, однако в отличие от сухого молока, белок на основе молочной сыворотки идентифицировать в готовом продукте и определить его как белок введенный с целью фальсификации будет невозможно (рис. 8).

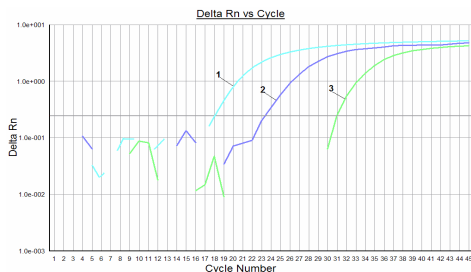


Рис. 8. Идентификация животных белков
1 – Эталонный образец; 2 – сухое молоко; 3 – белок на основе молочной сыворотки.

По окончании проведенных исследований по возможности идентификации животных белков, способы производства которых могут быть и химические (обезжиривание, обезвоживание) и механические (измельчение) процессы, были получены результаты, подтверждающие высокую чувствительность метода. Экстрагировать ДНК в необходимом количестве возможно из любого вида животного белка. Однако, идентифицировать их в готовом продукте, например в колбасных изделиях, будет не всегда возможно из-за низкого содержания ДНК.

Анализ практических возможностей применения разработанного метода для идентификации на основе ПЦР а реальном времени

С целью анализа практических возможностей применения метода идентификации на основе ПЦР в реальном времени были исследованы образцы мяса и мясных продуктов, приобретенные в торговых сетевых магазинах, а также образцы, направленные на исследования по заявке Испытательного Центра «ВНИИМП им. В.М. Горбатова» (табл. 2).

Большинство образцов дополнительно исследовали методом гистологической идентификации. Основанием для сравнения полученных результатов являлась этикетка продукта с указанием состава.

Таблица 2

Наименование и количество образцов пищевых продуктов исследуемых с целью определения их видового состава

НАИМЕНОВАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО
Колбасные изделия	60
Паштеты	15
Мясные консервы	21
Полуфабрикаты	73
Продукты «Халыль»	35

При исследовании колбасных изделий чаще всего в их составе выявляли присутствие соевых продуктов. По окончании ПЦР, в этом случае, наблюдали характерную специфическую реакцию. На рис. 9. представлен результат амплификации вареных колбас «Докторская», «Молочная» и «Русская», вырабатываемых в соответствии с рецептурой, предусмотренной ГОСТ Р на вареные колбасы.

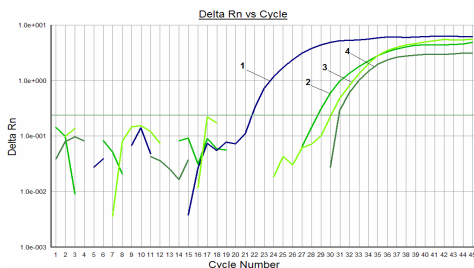


Рис. 9. Кривые флуоресценции накопленных продуктов в результате ПЦР в реальном времени 1 – эталонный образец ДНК (стандартный образец сои); ДНК, выделенная из колбас: 2 – «Докторская»; 3 – «Русская»; 4 – «Молочная».

Следует отметить, что во всех случаях выявления в составе колбасных изделий ДНК сои, соевые белковые продукты выявляли и методом гистологического анализа. Также гистологически выявляли и растительные углеводные добавки, такие как каррагинан, камедь и крахмал, наличие которых методом идентификации на основе ПЦР на данном этапе разработки выявить невозможно. При исследовании колбас, выработанных по ГОСТ, в отдельных случаях выявляли наличие в их составе не предусмотренных рецептурой мясных ингредиентов. В этом случае результаты гистологического анализа и анализа ПЦР не всегда совпадали.

Идентификация видовой принадлежности животных ингредиентов в составе паштетов методом гистологического анализа невозможна. Исследование методом ПЦР, например паштета «Нежный» с говяжьей печенью (рис. 10) показало, что в сыром составе помимо говядины была обнаружена ДНК свиньи, сельскохозяйственной птицы и сои. Эти результаты свидетельствуют о фальсификации данного продукта, т.к. на этикетке продукта не было данных о наличии в составе свинины, мяса птицы и сои.

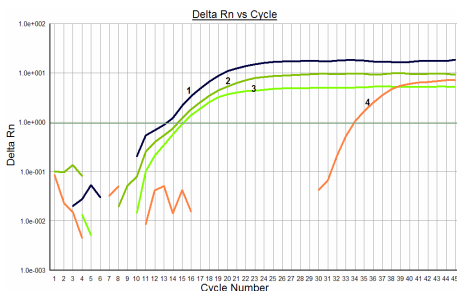


Рис. 10. Кривые флуоресценции накопленных продуктов в результате ПЦР в реальном времени

Исследования паштета «Нежный» с говяжьей печенью тест-наборами: 1 – «mtBOSi»; 2 – «mtSUSi»; 3 – «mtGAL/MELi»; 4 – «gSOYi».

Следует отметить, что основным способом фальсификации паштетов является частичная или полная замена мясных ингредиентов на ингредиенты другого вида животного.

При исследовании различных мясных консервов методом гистологического анализа выявляли наличие субпродуктов, крупных кровеносных сосудов и крупных фрагментов соединительной ткани, но без указания видовой принадлежности данных компонентов. В случае необходимости определения видовой принадлежности состава консервов использовали метод ПЦР. Фальсификацию животным белком гистологическим методом определяли только в том случае, когда белок был добавлен в виде шкурки и он не желатинизировался. Если животный белок использовался в виде измельченного порошка или суспензии выявляли данную фальсификацию только методом ПЦР. Наличие соевых продуктов в составе мясных консервов выявляли как методом гистологического анализа, так и методом ПЦР.

Анализ состава полуфабрикатов, в том числе пельменей, показал, что методом гистологической идентификации возможно выявить содержание животного белка и различные компоненты растительного происхождения: соевые белковые продукты, крахмал, полисахаридные гелеобразователи. Методом ПЦР в реальном времени идентифицировали видовую принадлежность мясных ингредиентов в составе полуфабрикатов, и в ряде случаев она не соответствовала указаниям на этикетке.

Исследования халяльной продукции было нацелено именно на определение видового состава мясных ингредиентов, и в этом случае возможно применение только метода, основанного на ДНК диагностике. В исследованных образцах методом ПЦР в реальном времени неоднократно было выявлено присутствие в составе ДНК свиньи, что свидетельствует о преднамеренной качественной и информационной фальсификации, вследствие отсутствия сведений на этикетке о фактическом составе продукта. На рис. 11 в качестве примера

представлен результат идентификации видового состава образца варено-копченой колбасы «Чужук», вырабатываемой по ТУ, в составе которой были прописаны следующие ингредиенты: конина, жир конский, соль, сахар, специи, чеснок и пищевые фосфаты. Как видно из рисунка, положительную специфическую реакцию давали наборы для идентификации ДНК быка, свиньи и курицы. Эти результаты свидетельствуют о фальсификации данного продукта, так как информация, указанная на этикетке, не соответствовала качественным показателям товара.

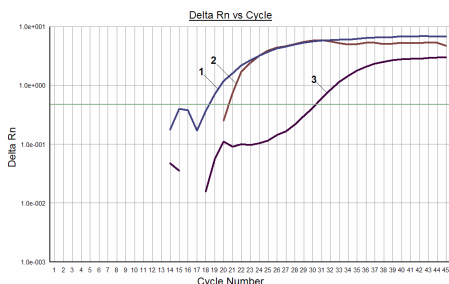


Рис. 11. Кривые флуоресценции накопленных продуктов в результате ПЦР в реальном времени
Исследования колбасы «Чужук» тест-наборами: 1 – «mtBOSi»; 2 – «mtSUSi»; 3 – «mtGAL/MELi».

Аналогичные результаты были получены и при исследовании других видов мясной халяльной продукции, что говорит о недостаточном контроле при продаже данной продукции в торговых сетях Москвы.

По итогам проведения исследований вышеупомянутых мясных продуктов был сделан следующий вывод: для ответа о фактическом составе исследуемого продукта недостаточно применения одного метода идентификации. На рис. 12 показаны практические возможности анализируемых методов идентификации и необходимость применения метода гистологического анализа и ПЦР одновременно.

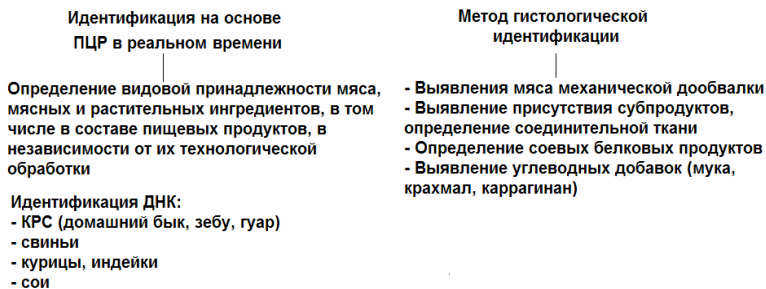


Рис. 12. Практические возможности методов ПЦР и гистологической идентификации

Разработать нормативную документацию на применение разработанного метода идентификации на основе ПЦР в реальном времени

В ходе выполнения научных исследований был разработан ГОСТ Р 52723-2007 Продукты пищевые и корма. «Экспресс-метод определения сырьевого состава (молекулярный)». Стандарт введен в действие с 01.06.2008 г. Стандарт распространяется на пищевые продукты, продовольственное сырье растительного, животного происхождения, корма и устанавливает экспресс-метод качественного определения видовой принадлежности содержащихся в них мясных и растительных ингредиентов. Стандарт предназначен для ускоренной идентификации видоспецифичной ДНК КРС, свиньи, курицы, сои и др. в составе кормов, сырья, полуфабрикатов, готовых продуктов питания методом ПЦР.

Разработаны методические рекомендации МР 4.2.0019-11 «Идентификация сырьевого состава мясной продукции». Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом РФ Г.Г. Онищенко. МР введены в действие с 18.04.2011 г. МР распространяются на методы качественного определения видовой принадлежности продуктов убоя сельскохозяйственных животных, птиц, а также ДНК растений. Методические рекомендации определяют методы подтверждения подлинности продуктов убоя сельскохозяйственных животных и птицы.

Был проведен расчет экономической эффективности применения метода идентификации на основе ПЦР в реальном времени. Результаты показали, что при исследовании партии (10 тонн) мясных изделий затраты составят в среднем порядка 75 рублей. При этом ущерб для предприятий, например с мощностью 100 тонн, снижается на 500 000 рублей в год (приблизительная сумма штрафа в случае выявления фальсификаций), одновременно исследование имеет большую социальную значимость.

ВЫВОДЫ:

1. На основании компьютерного анализа нуклеотидных последовательностей генов митохондриальной и ядерной ДНК сельскохозяйственных животных, птиц и растений выбраны гены-мишени и определены их консервативные участки. Сконструированы оригинальные видоспецифические праймеры и оптимизированы параметры ПЦР. Собраны наборы, позволяющие идентифицировать ДНК следующих биологических объектов: бык, зебу, свинья, курица, индейка, соя.

2. По итогам оценки диагностической способности разработанного метода на основе ПЦР в реальном времени установлено, что необходимый биологический объект может быть достоверно обнаружен при наличии не менее 20 копий его специфической ДНК в анализируемом анализе, что является практическим пределом обнаружения. Разработан образец ДНК, по которому можно отличить намеренную фальсификацию от случайной контаминации не декларируемым ингредиентом.

3. Исследования по определению лимитирующих факторов применения метода ПЦР в реальном времени показали, что метод позволяет идентифицировать необходимый биологический объект в составе продуктов, подвергнутых в ходе выработки, различным физическим, химическим и механическим воздействиям, и, таким образом, является универсальным по отношению к любым мясным продуктам.

4. Анализ практических возможностей применения метода идентификации на основе ПЦР показал необходимость и целесообразность его использования для определения видовой принадлежности мяса, мясных и растительных ингредиентов.

5. Разработан ГОСТ Р 52723-2007 Продукты пищевые и корма. «Экспресс-метод определения сырьевого состава (молекулярный)», введенный в действие с 01.06.2008 г., а также Методические рекомендации МР 4.2.0019-11 Методы контроля. Биологические факторы. «Идентификация сырьевого состава мясной продукции» используемые мясоперерабатывающими предприятиями с целью контроля качества сырья и мясной продукции, введенные в действие с 18.04.2011 г.

6. Расчет экономической эффективности применения метода показал, что при исследовании партии (10 тонн) мясных изделий затраты составят в среднем порядка 75 рублей. При этом ущерб за счет обмана потребителей, например, для предприятий с мощностью 100 тонн, снижается на 500 000 рублей в год, кроме того, исследование имеет большую социальную значимость.

По материалам диссертации опубликованы следующие работы:

1. Минаев М.Ю. Идентификация сырьевого состава мясного сырья и готовой продукции [Текст] / Минаев М.Ю., Лисицын Б.А., Фомина Т.А., Цветков И.Л. // Материалы IV ММК «Биотехнология: состояния и перспективы развития». – М. – 2007. – С. 187.

2. Фомина Т.А. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени – как современный метод оценки качества продукции [Текст] / Фомина Т.А. // ГНУ ВНИИМП им. В.М. Горбатова, Конференция-конкурс научно инновационных работ молодых ученых и специалистов

«Отделения хранения и переработки сельскохозяйственной продукции» Россельхозакадемии. – М. – 2007. – С. 142-144.

3. Фомина Т.А. Идентификация сырьевого состава мясопродуктов методом ПЦР-РВ [Текст] / Фомина Т.А., Минаев М.Ю. // Сборник материалов НПК «Интеграция фундаментальных и прикладных исследований – основа развития современных аграрно-пищевых технологий». – Углич. – 2007. – С. 350-352.

4. Tatyana A. Fomina. Identifikacija sirovinskog sastava mesnih i biljnih proizvoda metodom PCR u cilju otkrivanja falsifikata [Text] / Tatyana A. Fomina // Zbornik kratkih sadržaja, međunarodno 54. savetovanje industrije mesa. – Belgrad. – 2007. – III-8. – P. 114.

5. Tatyana A. Fomina. Identifikacija sirovinskog sastava mesnih i biljnih proizvoda metodom PCR u cilju otkrivanja falsifikata [Text] / Tatyana A. Fomina // Tehnologija mesa. – Belgrade. – 2007. – God. 49. – Br. 3-4. – P. 198-200.

6. Минаев М.Ю. Полимеразная цепная реакция для идентификации мясного сырья и готовой продукции [Текст] / Минаев М.Ю., Фомина Т.А. // Мясные технологии. – 2008. – № 2. – С. 34-36.

7. Минаев М.Ю. Метод ПЦР для определения сырьевых компонентов в готовой продукции [Текст] / Минаев М.Ю., Лисицын Б.А., Фомина Т.А. // Мясная индустрия. – 2008. – № 6. – С. 36-37.

8. Минаев М.Ю. Идентификация сырьевого состава мясопродуктов методом ПЦР-РВ [Текст] / Минаев М.Ю., Фомина Т.А. // Сборник докладов 11-ой МНПК памяти В.М. Горбатова. – 2008. – С. 120-123.

9. Фомина Т.А. Использование метода ПЦР для идентификации и количественной оценки мясного сырья и готовой продукции [Текст] / Фомина Т.А., Минаев М.Ю. // ГНУ ВНИИМП им. В.М. Горбатова, Конференция-конкурс научно-инновационных работ молодых ученых и специалистов «Отделения хранения и переработки сельскохозяйственной продукции» Россельхозакадемии. – М. – 2008. – С. 113-116.

10. Хвьяля С.И. Метод ПЦР – современный инструмент для установления видовой принадлежности растительного и животного сырья [Текст] / Хвьяля С.И., Минаев М.Ю., Фомина Т.А., Бурлакова С.С. // Мясной бизнес. – 2009. – № 2 (75). – С. 22-28.

11. Фомина Т.А. Общий подход к количественной оценке содержания сои в мясных продуктах методом Real Time ПЦР [Текст] / Фомина Т.А. // Сборник докладов 12-ой МНК памяти В.М. Горбатова. – М. – 2009. – С. 224-226.

12. Фомина Т.А. Система идентификации для контроля халяльной мясной продукции [Текст] / Фомина Т.А., Минаев М.Ю. // Мясная индустрия. – 2011. – № 3. – С. 32-34.

13. Минаев М.Ю. Количественная оценка содержания сои в мясных продуктах методом на основе ПЦР в реальном времени [Текст] / Минаев М.Ю., Фомина Т.А. // Мясной Бизнес. – 2011. – № 5. – С. 34-35.

14. Фомина Т.А. Разработка метода идентификации видовой принадлежности мясных и растительных ингредиентов на основе полимеразной цепной реакции в режиме реального времени [Текст] / Фомина Т.А. // ММНПК «Инновационные технологии – основа модернизации отраслей производства и переработки сельскохозяйственной продукции». – Волгоград. – 2011. – Ч. 2. – С. 175-189.

15. Minayev Mikhail Yu. Mogućnost korišćenja real time PCR metode za kvantitativnu ocenu sadržaja soje u proizvodima od mesa [Text] / Minayev Mikhail Yu., Fomina Tatyana A. // Zbornik kratkih sadržaja, međunarodno 56. savetovanje industrije mesa. – Belgrad. – 2011. – V-6. – P. 141.

16. Минаев М.Ю. Количественная оценка содержания сои в мясных продуктах методом ПЦР [Текст] / Минаев М.Ю., Хвыля С.И., Фомина Т.А. // Мясная индустрия. – 2011. – № 8. – С. 55-57.

17. Minaev M. The development of the system for quantitative assessment of soybean content in meat products by real time PCR [Text] / Minaev M, Fomina T. // 57th ICoMST. – Belgium. – 2011. – P. 288.